



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Papel diferencial de las isoformas de ciclooxygenasa y
sintasa de óxido nítrico en la vasoconstricción a la
fenilefrina en el lecho vascular renal y mesentérico de ratas
macho y hembra.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

NORBERTO IVÁN BAUTISTA GAYTÁN



DIRECTOR DE TESIS:
DR MAXIMILIANO IBARRA BARAJAS

Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo otorgado a los proyectos: Conacyt 102022, PAPIIT IN221615 y FESI-DIP-PAPCA 2D14-37.

Especial agradecimiento al Dr. Maximiliano Ibarra Barajas por la paciencia, confianza y apoyo brindado en todo momento para desarrollar el presente proyecto.

A los sinodales: Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras, Dra. Yolanda Irasema Chirino López, Dr. Luis Arturo Baiza Gutman y Dr. Rafael Villalobos Molina por las observaciones que ayudaron a enriquecer el proyecto.

A todos los miembros y amigos del laboratorio 3 de UBIMED: Dra. Patricia Castro, M. en C. Carmen Mondragón, Biól. Jessica López, Biól. Manuel López y especialmente a la M. en C. Marian Martínez, siempre obtuve apoyo de todos ustedes.

A mi familia: mis padres Víctor Bautista y Julieta Gaytán, a mi hermano Erwin Bautista.

A las personas que me acompañaron durante la carrera: Alejandra Lira, Daniel Cázares, Alfonso Flores, Gabriela Hernández y muy especialmente a Ada Rocío Morales.

INDICE

ABREVIATURAS	4
RESUMEN	6
INTRODUCCION	7
LECHO VASCULAR RENAL	7
LECHO VASCULAR MESENERICO	9
ARTERIAS	10
ENDOTELIO	12
FACTORES LIBERADOS POR EL ENDOTELIO	13
- Óxido nítrico	
- Prostanoides derivados de la actividad de ciclooxigenasas	
JUSTIFICACION	18
HIPOTESIS	19
OBJETIVOS	20
METODOLOGIA	21
RESULTADOS	23
- Lecho vascular renal	23
- Lecho vascular mesentérico	36
DISCUSION	47
CONCLUSIONES	54
BIBLIOGRAFIA	56

ABREVIATURAS

µg - microgramo

AA - Ácido araquidónico

AMPc - Adenosina monofosfato cíclico

Ang II - Angiotensina II

BH4 - Tetrahidrobiopterina

BK - Bradicina

COX 1, 2 - Ciclooxigenasa 1, 2

CE₅₀ - Concentración efectiva 50

EDHF - Factor hiperpolarizante derivado del endotelio

eNOS - Sintasa de óxido nítrico endotelial

EP - Receptor a prostaglandina E2

ET-1 - Endotelina 1

FAD - Flavin adenina dinucleótido

FMN - Flavin mononucleótido

GC - Guanilato ciclasa

GMPc - Guanosina monofosfato cíclico

HTA - Hipertensión arterial

iNOS - Sintasa de óxido nítrico inducible

IP - Receptor a prostaciclina

IP3 - Inositol trifosfato

L-NAME - NG-Nitro-L-arginine methyl ester

NADPH - Dinucleótido de nicotinamida adenina reducido

Nm - Nanomolar

nNOS - Sintasa de óxido nítrico neuronal

NO* - Óxido nítrico

NOS - Sintasa de óxido nítrico

ODQ - 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-alquinoxalin-1-one]

PGG2 - Prostaglandina G2

PGE2 - Prostaglandina E2

PGF2 α - Prostaglandina F2 α

PGI2 - Prostaciclina

PGs - Prostaglandinas

PLC - Fosfolipasa C

TXA2 - Tromboxano A2

RESUMEN

El tono vascular es regulado por diversos factores, entre ellos se encuentran los agentes vasodilatadores y vasoconstrictores producidos por el endotelio, estos mantienen un equilibrio homeostático. Entre los factores liberados por el endotelio están el óxido nítrico (NO*) sintetizado por las sintetasas de NO* (NOS) y los prostanoideos (PGs) derivados del ácido araquidónico (AA). El presente estudio tiene como finalidad conocer la actividad de estas enzimas en la regulación del tono vascular de arterias de resistencia, presentes en los lechos vasculares renal y mesentérico de ratas macho y hembra. Para ello, se evaluó el efecto del inhibidor no selectivo de NOS y de los inhibidores selectivos de las isoformas de NOS y ciclooxigenasas (COX) en la vasoconstricción inducida por fenilefrina y sobre la presión de perfusión basal. El inhibidor no selectivo de NOS (L-NAME) aumentó la presión de perfusión basal en riñón de machos y hembras y aumentó la contracción inducida por fenilefrina en machos, tal efecto no se presentó en riñón de hembras. La inhibición de iNOS aumentó la respuesta a fenilefrina con respecto al control en riñón de hembras; sin embargo, en riñón de machos no se presenta tal efecto. Los inhibidores selectivos de nNOS, COX 1 y 2 no provocan cambios importantes en la respuesta contráctil de fenilefrina ni en la presión de perfusión basal en riñón de ambos sexos. En relación al lecho mesentérico la influencia del NO* derivado de las isoformas de NOS, es mayor en hembras al estímulo contráctil y se observa participación discreta de prostanoideos vasodilatadores, producidos por la actividad de COX 2, al estímulo de la fenilefrina en lecho mesentérico de machos. Los inhibidores de NOS y COX no provocan cambios en la presión de perfusión basal de mesenterio de ratas macho y hembra. Estos resultados indican que existen diferencias funcionales dependientes del sexo y de lecho vascular en la participación de las isoformas de NOS sobre el estímulo vasocontráctil provocado por la fenilefrina en ratas Wistar.

Palabras clave: NOS, COX, riñón, lecho mesentérico, arterias de resistencia, fenilefrina.

INTRODUCCION

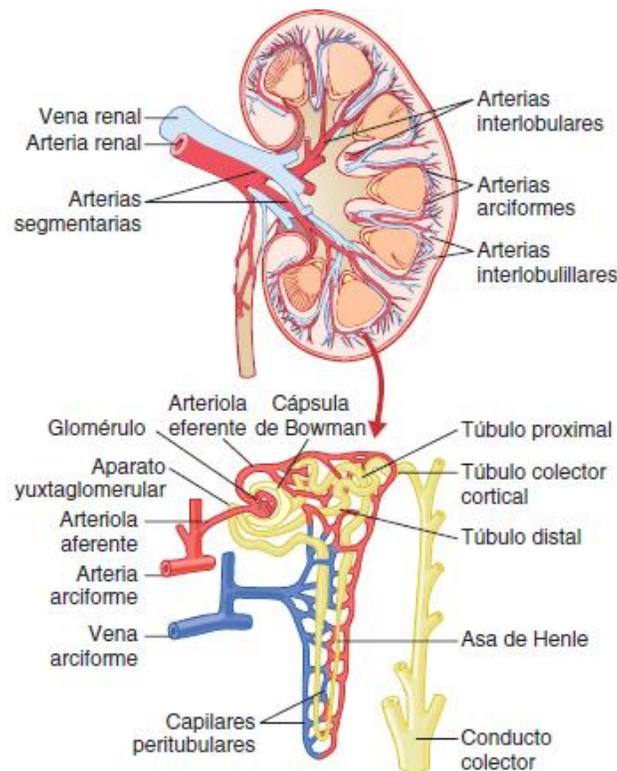
Lecho vascular renal

El riego sanguíneo de los riñones es normalmente de alrededor del 22% del gasto cardíaco, o 1.100 ml/min. La arteria renal entra en el riñón a través del hilio y después se ramifica progresivamente hasta formar las arterias interlobulares, las arterias arciformes, las arterias interlobulillares (también denominadas radiales) y las arteriolas aferentes, que acaban en los capilares glomerulares, donde se filtran grandes cantidades de líquido y solutos para comenzar la formación de orina (Esquema 1). Los extremos distales de los capilares de cada glomérulo forman la arteriola eferente, que llega a los capilares peritubulares que rodean a los túbulos renales (Guyton y Hall, 2011).

La circulación renal cuenta con dos lechos capilares, los capilares glomerulares y los peritubulares, que están dispuestos en serie y están separados por las arteriolas eferentes, que ayudan a regular la presión hidrostática en los dos grupos de capilares. La presión hidrostática alta en los capilares glomerulares (de ~60 mm Hg) da lugar a una filtración rápida, mientras que una presión hidrostática mucho menor en los capilares peritubulares (de ~13 mm Hg) permite la reabsorción rápida de líquido. Al ajustar la resistencia de las arteriolas aferente y eferente, los riñones pueden regular la presión hidrostática en los capilares glomerulares y peritubulares, cambiando el filtrado glomerular, la reabsorción tubular o ambas en respuesta a las demandas homeostáticas del cuerpo. Los capilares peritubulares se vacían en los vasos del sistema venoso, los vasos sanguíneos del sistema

venoso forman progresivamente la vena interlobulillar, la vena arciforme, la vena interlobular y la vena renal (Guyton y Hall, 2011).

La microcirculación renal es particularmente intrigante; ya que la dinámica de esta es esencial para el control apropiado de las fuerzas intracapilares e intersticiales que determinan la filtración glomerular, reabsorción de sal y fluidos y la regulación del gradiente de concentración glomerular (Arendshorst y Navar, 2007).



Esquema 1.- Principales vasos que participan en el riego sanguíneo renal (Guyton y Hall, 2011)

Por su riqueza el lecho vascular renal es muy sensible a los cambios de presión arterial sistémica. Para protegerse de ellos, el riñón es capaz de autorregular el flujo sanguíneo que lo irriga, asegurando en esa forma la normalidad de sus funciones y la filtración glomerular (Battilana, 1997).

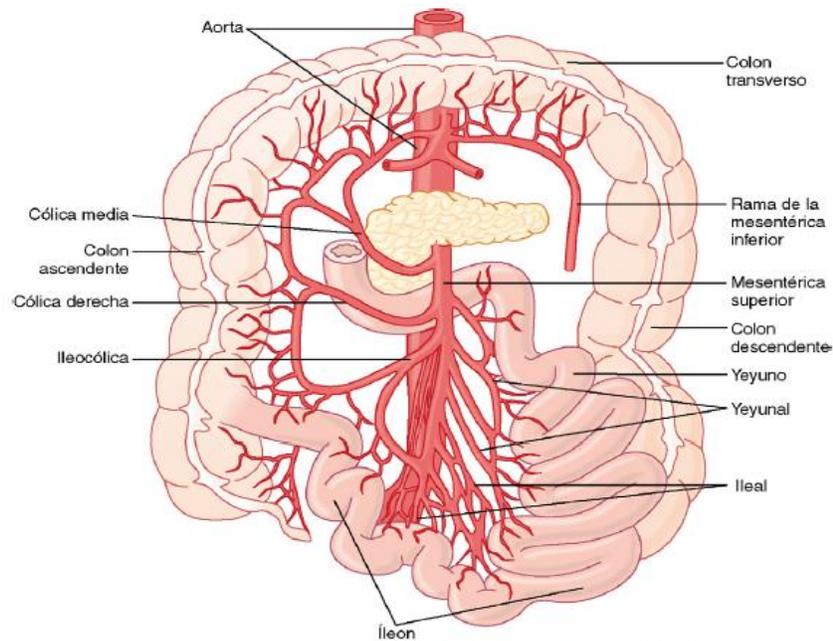
Lecho vascular mesentérico

La circulación mesentérica deriva de la arteria mesentérica, la cual tiene su origen en el segmento ventral primitivo, que forma parte de la circulación esplácnica e irriga el intestino, bazo, hígado y páncreas. Estos vasos tienen la capacidad de contraerse redistribuyendo la sangre desde el territorio abdominal hacia la circulación general, con el fin de mantener el flujo sanguíneo a órganos vitales (Roseblum, 1997).

El tono vascular es fundamental para la distribución del flujo sanguíneo, y es regulado por distintos factores locales (músculo liso y endotelio), sistémicos (sistema renina angiotensina), y nerviosos (sistema nervioso central). El gran volumen en la circulación mesentérica implica que la regulación del tono vascular mesentérico participa en el control de la presión sanguínea sistémica y el flujo sistémico tisular, por lo que alteraciones en su regulación pueden contribuir a la aparición de alteraciones en el flujo sanguíneo en distintas condiciones fisiopatológicas, tales como hipertensión arterial (HTA) y la diabetes (Sastre et al., 2010).

En el esquema 2 que muestra la irrigación arterial del tubo digestivo se observan las arterias mesentéricas superior e inferior, que irrigan las paredes del intestino delgado y grueso a través de un sistema arciforme. Al penetrar la pared del tubo, las arterias se ramifican y envían arterias circulares de menor calibre en todas direcciones, de estas derivan arterias más pequeñas que penetran la pared intestinal y se distribuyen a lo largo de los haces musculares, hacia las vellosidades intestinales y hacia los vasos situados bajo el epitelio, donde

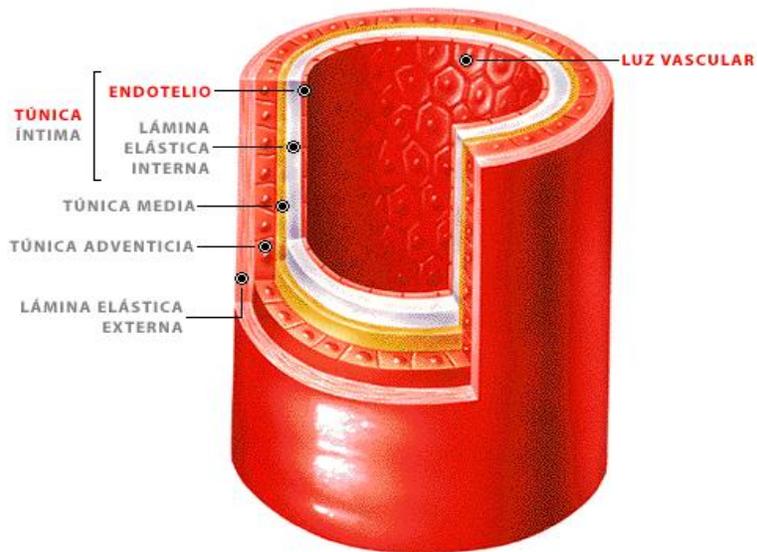
intervienen en las funciones secretoras y de absorción del intestino (Guyton y Hall, 2011).



Esquema 2.- Principales vasos que participan en el riego sanguíneo mesentérico (Guyton y Hall, 2011)

Arterias

Las arterias son vasos por los que circula la sangre del corazón a los tejidos con el oxígeno y nutrientes requeridos, las arterias de gran calibre (de conductancia) nacen en el corazón y se ramifican en arterias musculares de diámetro intermedio, estas se dividen en arteriolas, las cuales al entrar en los tejidos se ramifican en incontables vasos conocidos como capilares. Como se observa en el esquema 3 la pared de las arterias tienen tres túnicas: túnica interna, intermedia y externa, en la túnica interna se encuentra el endotelio (Tortora, 2003).



Esquema 3.- Principales elementos que conforman los vasos sanguíneos (Tortora, 2003)

El tono vascular es el principal regulador de la perfusión de órganos, la relajación y contracción de vasos de resistencia y de conductancia influye en la distribución del flujo sanguíneo y regulación de la presión arterial. El flujo sanguíneo en órganos es controlado por cambios en diámetro de los vasos de resistencia o de la red vascular, cambios en el tono vascular de estos vasos tienen un considerable impacto en el flujo sanguíneo de los órganos (Pohl, 2010).

Las arterias de resistencia (~20-250 μm de diámetro) son las mayores responsables de la resistencia vascular, ya que hasta el 50 % o más de la resistencia periférica parece estar proximal a los vasos con diámetros de 100 μm . En contraste, las arterias de conductancia (> 500 μm de diámetro) representan sólo una pequeña parte de la resistencia vascular periférica (Mulvany y Aalkjaer, 1990).

Endotelio

El tono vascular es controlado por varios mecanismos, incluidos el sistema nervioso simpático y el neuroendocrino, además de mecanismos locales como las sustancias vasoactivas liberadas por el endotelio tales como NO*, prostanoïdes (PGs), entre otros (Lamas y Rodriguez, 2012).

El endotelio vascular es un órgano estructuralmente simple y funcionalmente complejo, consiste de una capa unicelular de 10-50 µm de espesor que cubre la superficie interna de los vasos sanguíneos y conforma la pared de los capilares. Lejos de ser sólo una barrera mecánica entre la sangre y los tejidos, es un órgano activamente comprometido en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos. Debido a su ubicación estratégica detecta cambios en las fuerzas hemodinámicas que actúan sobre la pared vascular, así como señales químicas transportadas por la sangre y responde a ellas liberando sustancias vasoactivas, algunas de las cuales tienen funciones antagónicas como vasodilatadores o vasoconstrictores (Landmesser, 2007). El balance entre la producción de vasoconstrictores y vasodilatadores derivados del endotelio es determinante en la regulación del tono vascular (Pollock, 2002).

El endotelio modula el tono vascular por la liberación de factores relajantes tales como NO*, factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), bradicinina (BK) y prostaciclina (PGI₂) y factores contráctiles tales como Angiotensina II (Ang II) y endotelina-1 (ET-1) (Vanhoutte et al., 2009; Ibarra et al., 1995; Ibarra et al., 2006). Las células endoteliales, actualmente son reconocidas como fuente productora de

sustancias de acción autocrina y paracrina, de trascendente participación en la vasorregulación, la coagulación y la fibrinólisis (Furchgott y Zawadzki, 1980).

- Factores liberados por el endotelio

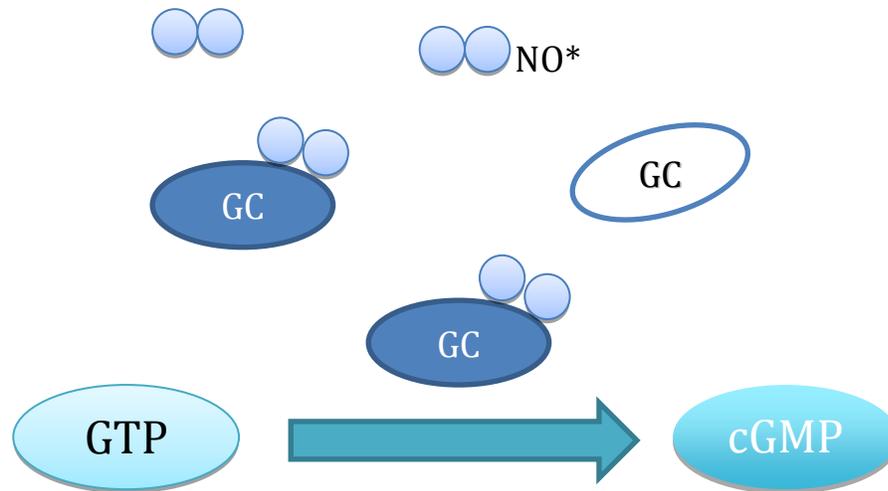
Óxido nítrico

El NO* es un radical libre que es sintetizado enzimáticamente en muchas células y tejidos del organismo, la enzima responsable de su síntesis es la sintasa de óxido nítrico, la cual está encargada de la conversión de L-arginina a L-citrulina en presencia de oxígeno y NADPH (dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato reducida), la reacción comprende la transferencia de electrones de NADPH a través de las flavinas FAD (Flavina adenina dinucleótido) y FMN (Flavina mononucleótido) desde el dominio de reductasa carboxilterminal al hemo en el dominio oxigenasa amino terminal de la NOS, donde el sustrato L-arginina es oxidado a L-citrulina y NO* (Rochette et al., 2013).

Es además fundamental la presencia de la tetrahidrobiopterina (BH4) como cofactor. La BH4 es una potente molécula reductora, si los niveles de BH4 son insuficientes cuando se activa la eNOS se forma anión superóxido (O₂*) en vez de NO*, contribuyendo así a la disfunción endotelial (Alp, 2003).

Existen 3 isoformas de la sintasa: la NOS neuronal (nNOS), la NOS endotelial (eNOS) y la NOS inducible (iNOS), estas son codificadas por diferentes genes y comparten 55% a 60% de homología en la secuencia de aminoácidos (Kone, 2004).

El NO* derivado del endotelio difunde a través de las células del musculo liso vascular y activa la guanilato ciclasa (GC), produciendo guanosina monofosfato cíclico (GMPc) y la relajación, tal como se muestra en el esquema 4 (Schimidt, 1993).



Esquema 4.- Mecanismo de acción del NO*

El NO* es un importante modulador de la hemodinámica renal y glomerular, la respuesta túbuloglomerular y la presión natriurética (Majid, 2001). El NO* sintetizado en riñón es responsable de más de 1/3 del flujo sanguíneo renal normal y ayuda a mantener la resistencia vascular renal baja en condiciones normales. Aunque la inhibición de las NOS no interfiera en el mecanismo regulatorio del glomérulo sí decrece el flujo sanguíneo renal total (Ichihara, 1999). El NO* juega un papel importante en la regulación de la perfusión de la médula renal (Mattson, 2000).

Debido a que el NO* es altamente reactivo y difunde con facilidad, su producción por cada isoforma es regulada a múltiples niveles, desde la transcripción genética

hasta la regulación alostérica de la enzima. Existe evidencia que indica que las isoformas de NOS están diferencialmente distribuidas y reguladas en el riñón; sin embargo, aun continua la controversia acerca de si la expresión de proteínas funcionales para las isoformas de NOS, es específica en poblaciones de células renales (Kone, 2004).

Aunque el óxido nítrico tiene un papel benéfico sobre la vasculatura su producción excesiva puede ser citotóxica, el resultado de la reacción de NO* con especies reactivas de oxígeno y especies nitrogenadas, lleva a la formación de del anión peroxinitrito, radical nitroxilo y radical hidroxilo (Levonen, 2001). La producción excesiva de NO* contribuye a la generación de una variedad de enfermedades renales y vasculares tales como, glomerulonefritis, falla renal post isquémica y nefropatía obstructiva (Gabbai, 2002).

En diferentes condiciones fisiopatológicas, como la hipertensión arterial o la diabetes mellitus, la relajación dependiente de endotelio está disminuida, lo cual se ha asociado con una menor biodisponibilidad de NO*, una alteración en la producción de PGs (incluyendo prostaciclina y tromboxano), un deterioro de la hiperpolarización dependiente de endotelio, así como una mayor liberación de endotelina-1, pueden individualmente o en conjunto contribuir a la disfunción endotelial (Harrison, 1997).

Las contracciones dependientes de endotelio son mejor observadas en la presencia de inhibidor de NOS (L-NAME), sin embargo el tratamiento con ODQ (1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-alquinoxalin-1-one]) que es inhibidor de la guanilato ciclasa soluble puede enmascarar la contracciones dependientes de endotelio,

indicando que el NO* *per se* puede no inhibir la liberación de los factores contráctiles derivados del endotelio (Yang et al 2004).

Ciclooxigenasas

Los PGs son formados por las ciclooxigenasas (COXs), de las cuales hay 2 isoformas: la COX-1 y la COX-2. La COX-1 es constitutiva y en el riñón se expresa en el endotelio y epitelio, está específicamente localizada en las células de los túbulos medulares y corticales. La COX-2 puede ser inducida por estímulos inflamatorios, *shear stress* (estrés de rozamiento), factor de necrosis tumoral α (TNF α), lipopolisacáridos y es constitutiva en la *macula densa* (Komhoff et al., 1997).

Las ciclooxigenasas convierten el AA en prostaglandinas G2 (PGG2) y H2 (PGH2), el último es catalizado enzimáticamente por las respectivas sintasas de los PGs dando lugar a los diferentes prostanoides (PGD2, PGE2, PFG2 α , PGI2 y TXA2) y estas se unen a su respectivo receptor acoplados a proteína G (Smith, 1996). El tipo de prostaglandina generada depende de la expresión y actividad de la sintasa de prostaglandina (Tang y Vanhoutte, 2008).

Las PGs tienen un papel importante en el control fisiológico del tono vascular, liberación de renina y presión arterial (Francois y Coffman, 2004).

La acción de factores contráctiles derivados del endotelio y el NO* aparentan ser independientes una de otra; sin embargo, la producción de COX-2 es modulada por NO* (Perez y Lamas, 2012).

La inhibición selectiva de COX-2 tiene efectos mínimos en hemodinámica renal de sujetos normales (Cheng, 2004). La inhibición selectiva de COX-1 no altera la perfusión medular o cortical en riñón de ratón, mientras en este mismo modelo la inhibición de COX-2 disminuye el flujo sanguíneo medular (Qi, 2002).

PGE₂ y PGI₂ (prostaciclina) son los metabolitos más importantes sintetizados por la COX en endotelio de la microcirculación renal y glomerular. Los receptores EP para PGE₂ son los más abundantes localizados en todo el riñón (Breyer, 1998) y se encuentran distribuidos diferencialmente, el receptor EP₄ está altamente expresado en glomérulo y su activación está relacionada a la vasorelajación (Sugimoto, 2002). La PGI₂ ejerce sus efectos biológicos a través del receptor IP, el cual tiene 7 dominios transmembranales y está acoplado a proteína G que incrementa la generación de AMPc en los vasos renales y está localizado en la microvasculatura renal y glomerular (Nasrallah, 2005).

Tromboxano A₂ (TXA₂) es un metabolito generado por COX normalmente producido en bajos niveles por las células musculares lisas vasculares (Navar, 1996). El TXA₂ actúa en los receptores TP que son acoplados a proteína G que activan las fosfolipasa C (PLC), resultando en aumento de niveles de inositol trifosfato (IP₃) y movilización de Ca²⁺ desde los almacenes intracelulares, provocando la vasoconstricción (Ohkubo, 1996). Otro metabolito derivado de COX que puede activar el receptor TP en arteriolas aferentes es el producto del estrés oxidativo 8-isoprostaglandina F₂α (Fukunaga, 1997). Bajo condiciones basales los niveles de TXA₂ son bajos y la vasoconstricción renal mediada por el receptor TP no es aparente (Boffa, 2004).

JUSTIFICACIÓN

El papel de las COXs y de las NOS sobre el tono de la vasculatura renal y mesentérica ha sido evaluado en diversos estudios (D'Abril Ruíz-Leyja et al., 2013; Sullivan, 2002); sin embargo, no existen reportes que indiquen la implicación funcional de cada isoforma de NOS o COXs sobre la regulación del tono vascular renal y mesentérico, y además se desconoce si tienen participación diferencial en machos y hembras. El presente trabajo tiene como objetivos caracterizar el papel funcional de las isoformas de NOS y COXs en la regulación del tono vascular renal y mesentérico de ratas Wistar así como determinar la influencia del sexo en la actividad funcional de las diferentes isoformas.

HIPÓTESIS

Las isoformas de NOS y COX tienen un papel diferencial en la regulación del tono vascular renal y mesentérico y en el sexo de la rata.

OBJETIVOS

1.- Caracterizar la participación de las isoformas de sintasas de óxido nítrico (nNOS, eNOS, iNOS) en la regulación del tono vascular renal y mesentérico de ratas Wistar hembra y macho.

2.- Caracterizar la participación de las isoformas de ciclooxigenasas (COX1 y COX2) en la regulación del tono vascular renal y mesentérico de ratas Wistar hembra y macho.

METODOLOGIA

Se utilizaron ratas macho y hembra de la cepa Wistar (n=6 por grupo), de 8 a 10 semanas de edad. Estas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p). Se realizó una laparotomía abdominal y se canuló, a través de la arteria mesentérica, el riñón derecho y el mesenterio, para realizar la perfusión *in situ*, posteriormente se colocaron en una preparación tipo Langerdoff para la perfusión *in vitro* con solución Krebs en constante oxigenación (95% O₂ y 5% CO₂) a 37 °C, pH 7.4 con un flujo constante de perfusión (8 ml/min para machos y 6 ml/min para hembras). Los tejidos se estabilizaron durante 60 minutos, la presión de perfusión se midió con el transductor de presión TSD105 (Biopac Systems) acoplado a un sistema de adquisición de datos MP100 (Biopac Systems). Se realizaron curvas concentración-respuesta a fenilefrina (0.031-100 nmol) en ausencia y presencia del inhibidor no selectivo para las NOS NG-nitro-L-arginine Methyl ester, L-NAME (1x10⁻⁶M y 1x10⁻⁵M), del inhibidor selectivo de iNOS 1400W (1x10⁻⁷M), del inhibidor selectivo de nNOS N-propyl-L-arginine (3.1x10⁻⁷M y 1x10⁻⁷ M), de los inhibidores selectivos de COX1 SC560 (1x10⁻⁷M) y COX2 DuP 697 (1x10⁻⁷M). Cabe señalar que todas las curvas fueron realizadas en presencia de antagonistas α₂ y β adrenérgicos (rauwolscina 1x10⁻⁷M y propranolol 1x10⁻⁷M). También se analizó el efecto de los diferentes inhibidores sobre la presión de perfusión basal en los diferentes tejidos.

Los datos representan la media ± de (desviación estándar) de 5 a 6 riñones y mesenterios de ratas machos o hembras. En los experimentos de mesenterio y riñón perfundido los resultados se expresan como incremento de la presión de

perfusión inducida por la fenilefrina (agonista de receptores α_1 adrenérgicos). Para el análisis de datos se emplearon diferentes softwares como el AcqKnowledge (Versión 3.9.1), Microsoft Excel (Versión 2010) y Sigma Plot (Versión 11). Para determinar si hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) al estímulo contráctil entre los grupos se realizó ANOVA de 2 vías y posteriormente prueba de Tukey. Se realizó ANOVA de 1 vía para determinar si existen diferencias ($p < 0.05$) en la presión de perfusión basal de los grupos.

RESULTADOS

Los resultados se muestran como curvas concentración–respuesta a fenilefrina, en riñón y mesenterio de ratas Wistar macho y hembra en ausencia y presencia de concentraciones crecientes del inhibidor no selectivo de las NOS, L-NAME, y de los inhibidores selectivos de las diferentes isoformas de NOS y COX.

RESULTADOS LECHO VASCULAR RENAL

La fenilefrina provocó un aumento en la presión de perfusión del riñón de manera dependiente de la concentración en ambos géneros (Fig. 1), no se encontraron diferencias significativas en la respuesta vasopresora a fenilefrina entre machos y hembras (Fig. 1).

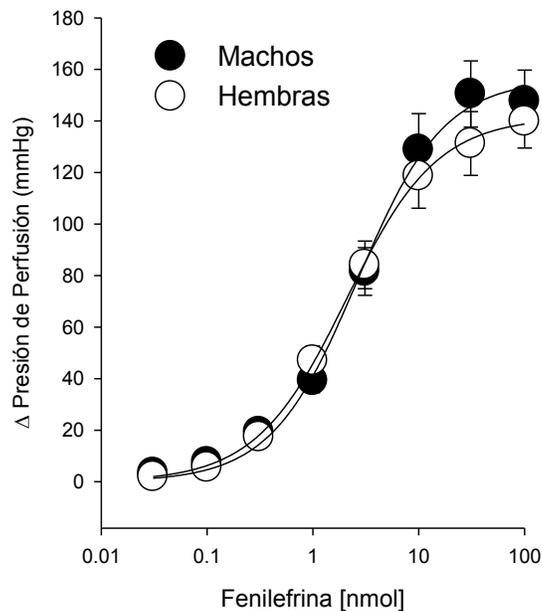


Fig. 1.- Respuesta a fenilefrina en riñón de ratas Wistar macho y hembra

La inhibición de la NOS con L-NAME (1×10^{-5} M) incrementó la presión de perfusión basal tanto en machos como en hembras (Fig. 2A y Fig. 2B), sugiriendo que la liberación basal de NO* es regula el tono vascular renal.

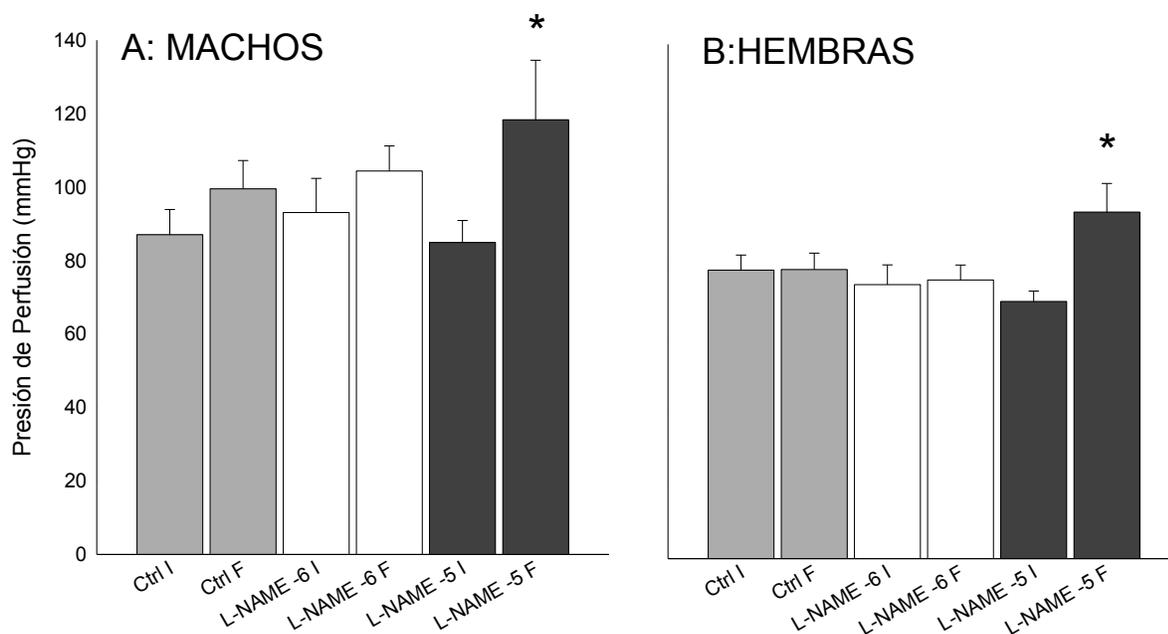


Fig. 2.- Efecto del L-NAME (Inhibidor de las NOS) en la presión de perfusión basal en riñón de ratas Wistar, **A** macho y **B** hembra. * $p < 0.05$ vs Presión de perfusión inicial (n=5-6 animales por grupo) I= Presión de perfusión inicial, F= Presión de perfusión final.

Además, en el riñón de macho el L-NAME (1×10^{-6} M) provocó un desplazamiento hacia la izquierda de la curva concentración-respuesta a fenilefrina, alcanzando un mayor efecto máximo ($p < 0.05$) con respecto al control (Fig. 3 A y tabla 1), esto sugiere que el NO* participa en la regulación de tono vascular renal provocado por la fenilefrina en ratas Wistar macho, tal efecto no se presenta en riñón de hembras

por lo que el NO* derivado de eNOS pudiera tener menor relevancia en la regulación de la respuesta contráctil a fenilefrina en comparación con los machos (Fig. 3 B). Al aumentar la concentración del inhibidor L-NAME (1×10^{-5} M), en el riñón de machos la curva se desplaza a la izquierda a concentraciones bajas; sin embargo, el efecto máximo es significativamente menor con respecto al control (Fig. 3 A y tabla 1), esto podría ser explicado por el aumento de la presión de perfusión basal provocado por la presencia del L-NAME, tal como se muestra en la figura 2 A. En el riñón de hembras la inhibición de la síntesis de NO* con L-NAME (1×10^{-5} M) desplazó la curva discretamente y sin significancia estadística, a la izquierda respecto al control y sin cambio en el efecto máximo (Fig. 3 B). Los presentes resultados sugieren que hay mayor participación del óxido nítrico en la regulación del tono vascular renal en respuesta al estímulo contráctil a la fenilefrina en machos que en hembras.

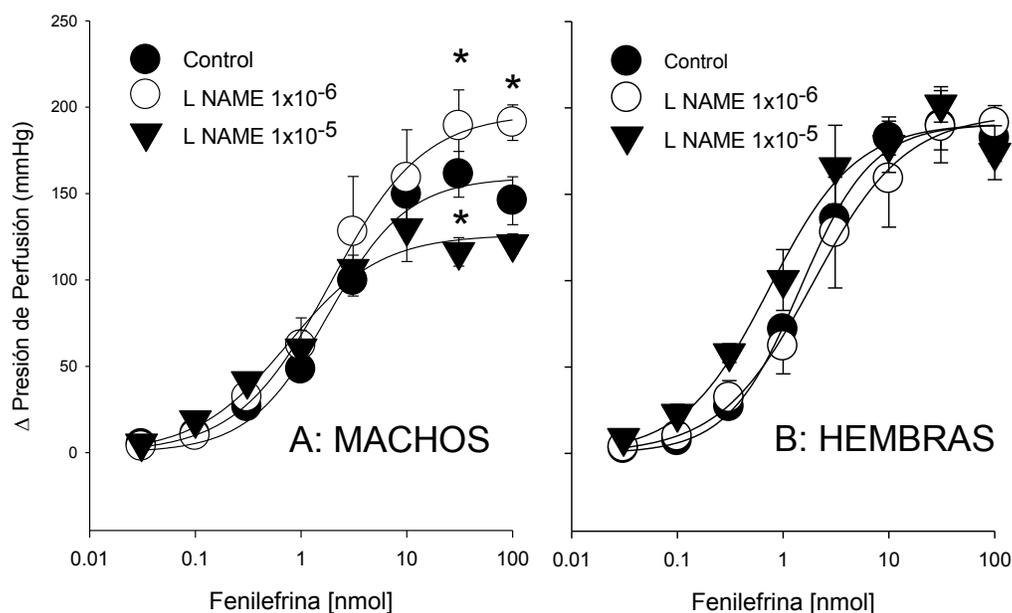


Fig. 3.- Efecto del L-NAME (Inhibidor de las NOS) en la vasoconstricción inducida por fenilefrina en riñón de ratas Wistar, **A** macho y **B** hembra. * $p < 0.05$ respecto al control (n=5-6 animales por grupo).

Tabla 1.- Datos de CE_{50} y E_{max} obtenidos de la vasoconstricción inducida por fenilefrina en riñón de Wistar macho y hembra en presencia de L-NAME.

	CE 50	CE 50	E_{max}	E_{max}
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar
Control	1.89±0.22	1.57±0.27	160.45±9.7	191.83±12
L NAME -6	1.14±0.13	3.02±1.19	198.96±9.6	201.64±9.5
L NAME -5	0.78±0.06	0.87±0.19	127.03±8.8	194.05±9.6

En la figura 4 A y B se muestra el efecto del inhibidor 1400 W (inhibidor selectivo de iNOS) sobre la presión del perfusión basal, como observa, el inhibidor no

provoca cambios, esto indica que el NO* sintetizado por la isoforma inducible no participa en la regulación del tono vascular renal de ratas macho y hembra.

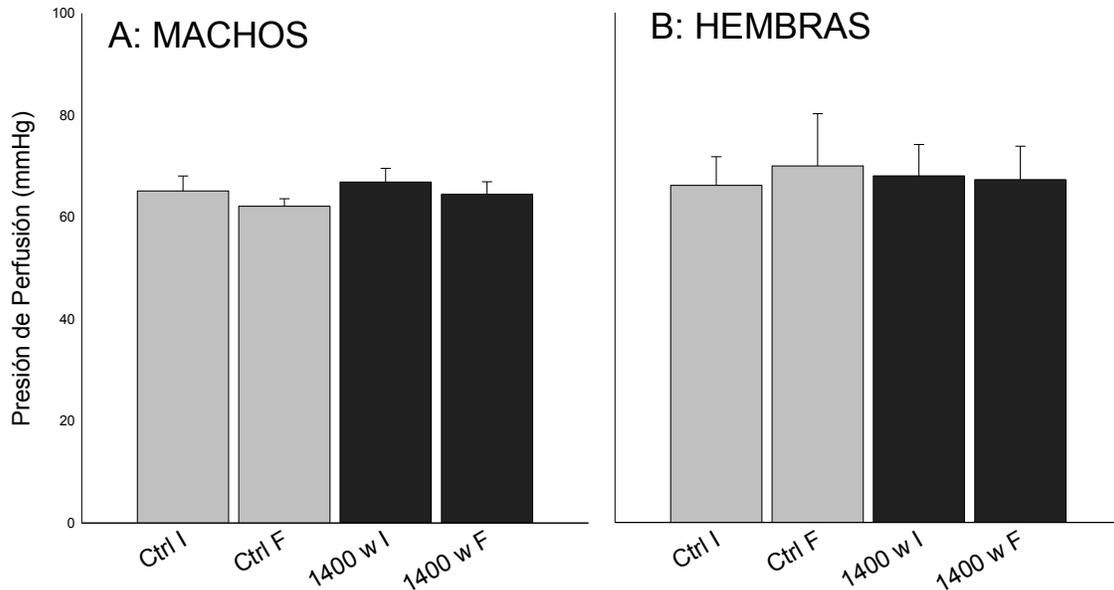


Fig. 4.- Efecto de 1400w (Inhibidor de las iNOS) en la presión de perfusión basal en riñón de ratas Wistar, **A** macho y **B** hembra. (n=5-6 animales por grupo) I= Presión de perfusión inicial, F= Presión de perfusión final.

Posteriormente se evaluó el efecto del inhibidor a la concentración de $1 \times 10^{-7} M$ sobre la respuesta vasoconstrictiva inducida por fenilefrina en riñón de ratas Wistar macho y hembra. En riñón de machos (Fig. 5 A y tabla 2) se observa que la inhibición de la isoforma inducible de NOS no provocó cambios en la respuesta a fenilefrina, excepto por una ligera disminución en el efecto máximo con respecto al control, esto indica que el NO* derivado de iNOS no participa en la modulación del estímulo contráctil provocado por la fenilefrina en este género. Por el contrario, en el riñón de hembras (Fig. 5 B y tabla 2) se observa un desplazamiento

significativo de la curva a la izquierda con respecto al control, este efecto indica que hay liberación de NO* derivado de iNOS, con el estímulo vasopresor.

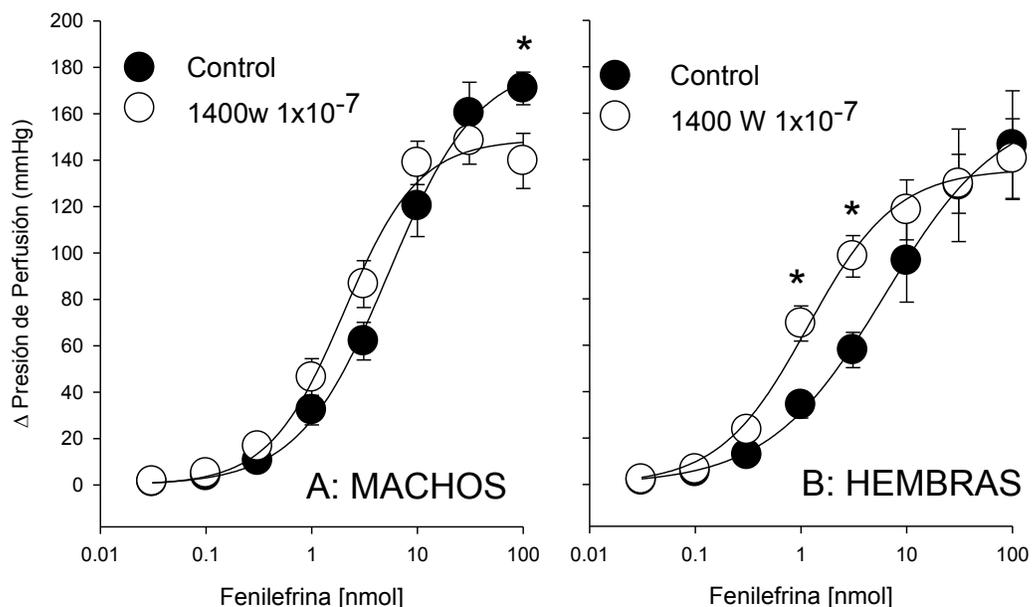


Fig. 5.- Efecto del 1400W (Inhibidor de las iNOS) en la vasoconstricción inducida por fenilefrina en riñón de ratas Wistar, **A** macho y **B** hembra. * $p < 0.05$ respecto al control (n=5-6 animales por grupo).

Tabla 2.- Datos de CE₅₀ y Emax obtenidos de la vasoconstricción inducida por fenilefrina en riñón de Wistar macho y hembra en presencia de 1400w.

	CE 50 Machos Wistar	CE 50 Hembras Wistar	Emax Machos Wistar	Emax Hembras Wistar
Control	4.99±0.72	5.02±1.66	179.20±17	163.33±28
1400 W	2.20±0.51	2.50±0.91	149.20±9	152.28±12.9

En la figura 6 A y B se muestra que el inhibidor de la nNOS no alteró la presión de perfusión basal, por lo que se asume que la nNOS no participa en la regulación del tono de las arterias de resistencia renales de ratas Wistar macho y hembra.

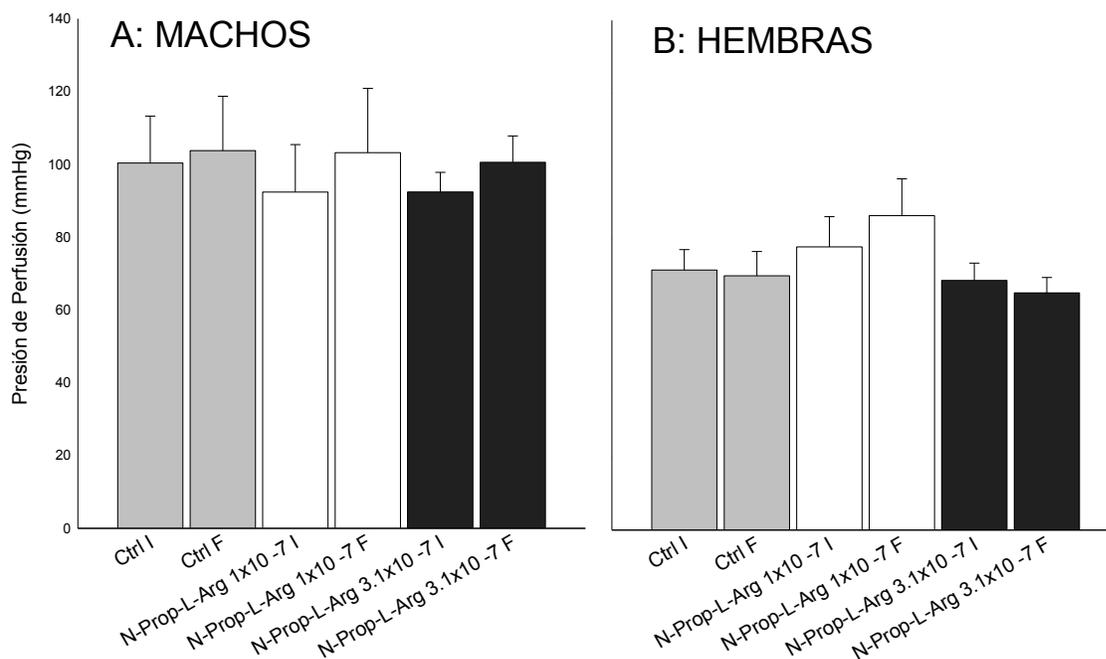


Fig. 6.- Efecto de N-prop-L-arg (Inhibidor de las nNOS) en la presión de perfusión basal en riñón de ratas Wistar **A** macho y **B** hembra. (n=5-6 animales por grupo) I= Presión de perfusión inicial, F= Presión de perfusión final.

Para caracterizar la participación en la regulación del tono vascular renal de la isoforma neuronal de NOS (nNOS) se evaluó el efecto del inhibidor selectivo (N-propyl-L-arginine) a concentraciones crecientes 1×10^{-7} y $3.1 \times 10^{-7} \text{M}$ sobre la respuesta contráctil a fenilefrina en riñón de ratas macho y hembra. En riñón de machos (Fig. 7 A y tabla 3) el efecto presor de la fenilefrina no muestra diferencias significativas con respecto al control, esto indica que en los machos la isoforma neuronal no participa en la regulación del tono vascular renal inducido por fenilefrina. En riñón de hembras se observan resultados similares, pero se encontró aumentó en el efecto máximo con la inhibición de la nNOS (Fig. 7 B y tabla 3).

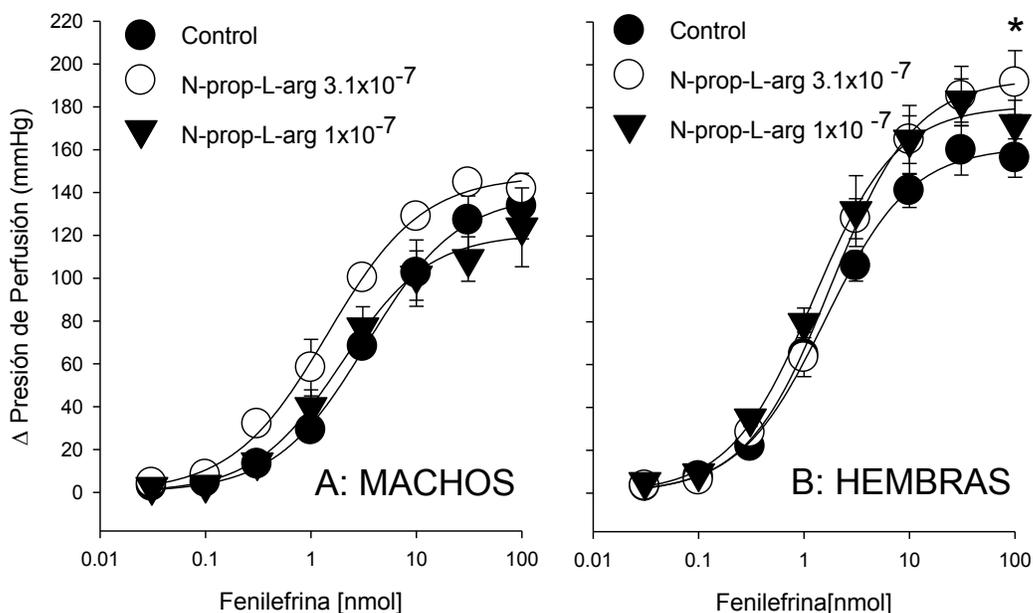


Fig. 7.- Efecto de N-prop-L-arg (inhibidor de las nNOS) en la vasoconstricción inducida por fenilefrina en riñón de ratas Wistar, **A** macho y **B** hembra. * $p < 0.05$ respecto al control (n=5-6 animales por grupo).

Tabla 3.- Datos de CE₅₀ y Emax obtenidos de la vasoconstricción inducida por fenilefrina en riñón de Wistar macho y hembra en presencia de N-propil-L-arginine.

	CE 50	CE 50	Emax	Emax
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar
Control	4.02±1.05	1.67±0.29	137.16±5.30	160.52±11.15
N-prop-Larg				
1x10⁻⁷	2.43±0.50	1.74±0.51	125.15±18.5	189.31±14.49
N-prop-Larg				
3.1x10⁻⁷	1.52±0.46	2.13±0.42	147.20±5.86	198.56±16.18

Se determinó el efecto del inhibidor de COX 1 en la presión de perfusión basal (Fig. 8 A y B) y se muestra que el inhibidor no provocó cambios con respecto al control, esto sugiere que COX 1 en condiciones basales no libera prostanoïdes vasodilatadores que regulen el tono vascular de lecho renal de machos y hembras Wistar.

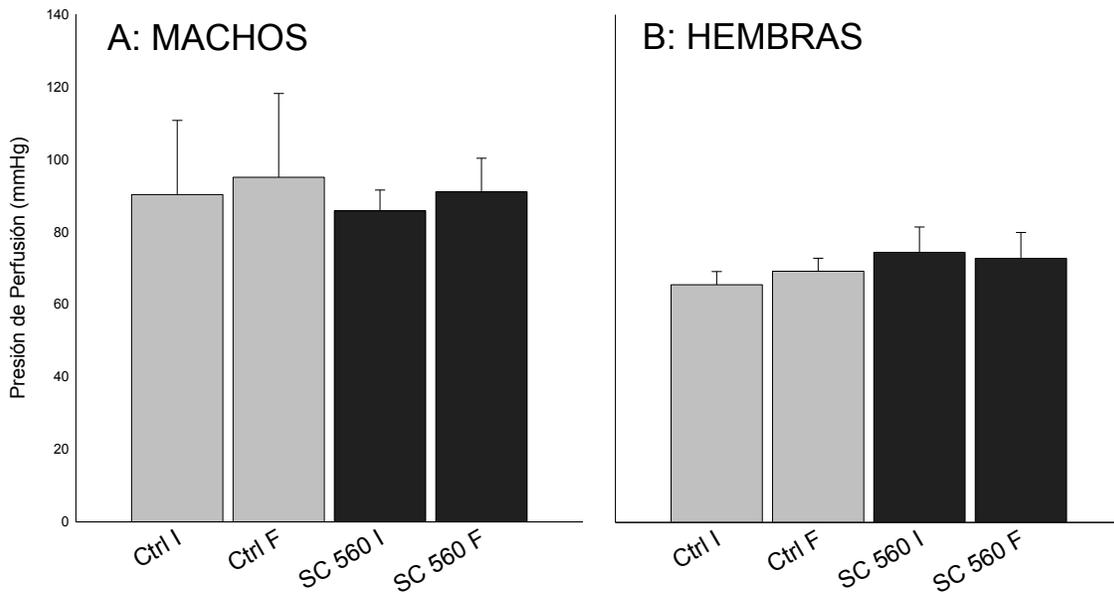


Fig. 8.- Efecto de SC 560 (inhibidor de la COX 1) en la presión de perfusión basal en riñón de ratas Wistar, **A** macho y **B** hembra. (n=5-6 animales por grupo) I= Presión de perfusión inicial, F= Presión de perfusión final.

Se obtuvieron gráficas concentración-respuesta a fenilefrina en presencia y ausencia del inhibidor selectivo de COX 1 (SC560) a $1 \times 10^{-7} \text{M}$, esto para determinar la participación de los prostanoïdes generados por COX 1 en la regulación del tono vascular renal de ratas Wistar macho y hembra. En riñón de machos (Fig. 9 A y Tabla 4) el inhibidor no provoca cambio con respecto al control, lo que sugiere que COX 1 no participa en la liberación de prostanoïdes que regulen el tono renal inducido por fenilefrina en riñón de machos. Respecto a las hembras (Fig. 9 B y Tabla 4) no hubo diferencias con respecto al control al inducir vasoconstricción con fenilefrina en presencia del inhibidor.

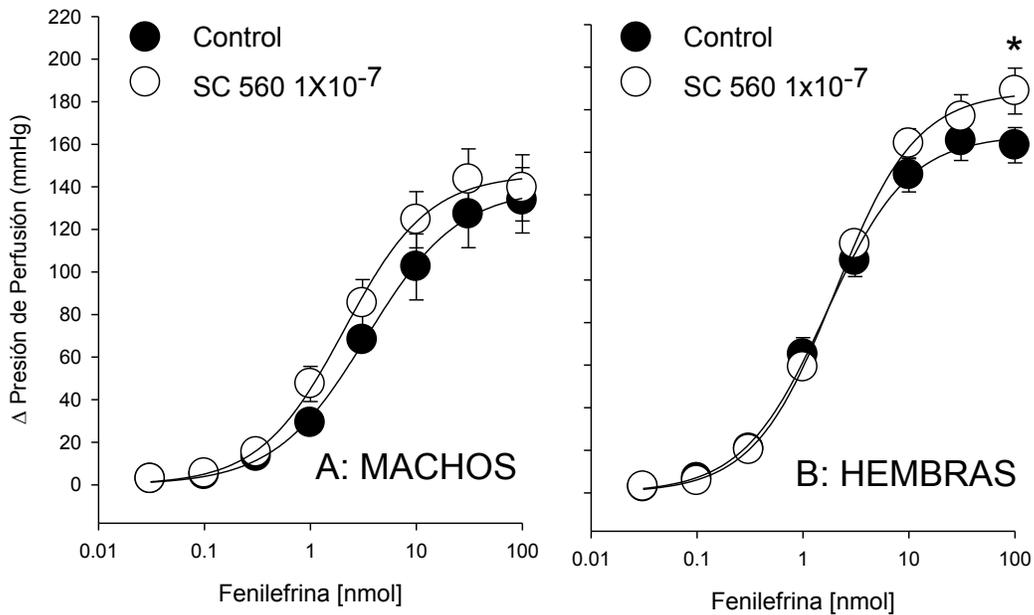


Fig. 9.- Efecto de SC 560 (Inhibidor de la COX 1) en la vasoconstricción inducida por fenilefrina en riñón de ratas Wistar, **A** macho y **B** hembra. *p <0.05 respecto al control (n=5-6 animales por grupo).

Tabla 4.- Datos de CE₅₀ y Emax obtenidos de la vasoconstricción inducida por fenilefrina en riñón de Wistar macho y hembra en presencia de SC 560

	CE 50 Machos Wistar	CE 50 Hembras Wistar	Emax Machos Wistar	Emax Hembras Wistar
Control	4.02±1.05	1.674±0.297	141.52±14.69	166.64±9.30
SC 560	2.523±0.63	1.939±0.292	149.34±15.8	194.19±9.96

En la figura 10 A y B se muestra que el inhibidor de la COX 2 no tuvo efecto sobre la presión de perfusión basal, por lo cual se sugiere que COX 2 no participa

liberando prostanoïdes basalmente que regulen el lecho vascular renal de machos o hembras.

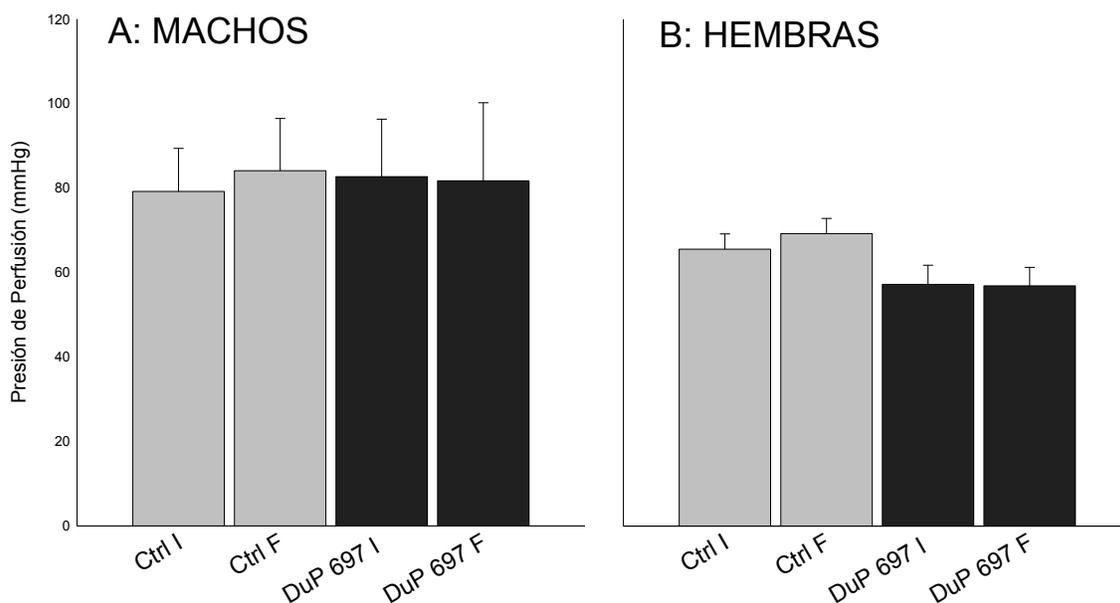


Fig 10.- Efecto de DuP 697 (inhibidor de la COX 2) en la presión de perfusión basal en riñón de ratas Wistar, **A** macho y **B** hembra. (n=5-6 animales por grupo) I= Presión de perfusión inicial, F= Presión de perfusión final.

Por último se evaluó la respuesta vascular renal a fenilefrina en presencia y ausencia del inhibidor selectivo de COX 2 en ratas Wistar macho y hembra, obteniéndose curvas concentración-respuesta (Fig. 11 A y B), en estas no se presentan diferencias a la respuesta vasoconstrictora provocada por fenilefrina, con respecto al control en ningún sexo, por lo que se sugiere que los prostanoïdes derivados de COX2 en lecho vascular renal de ratas Wistar macho y hembra no participan en el mantenimiento del tono vascular provocado por fenilefrina, los datos de CE₅₀ y E max apoyan dicha afirmación (Tabla 5).

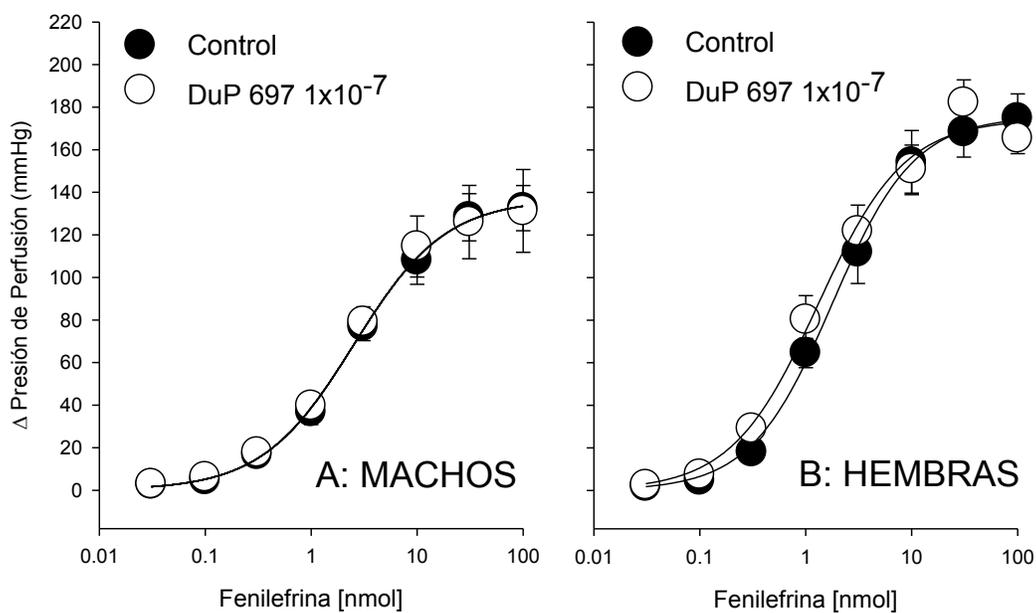


Fig. 11.- Efecto de DuP 697 (Inhibidor de la COX 2) en la vasoconstricción inducida por fenilefrina en riñón de ratas Wistar, **A** macho y **B** hembra. * $p < 0.05$ respecto al control (n=5-6 animales por grupo).

Tabla 5.- Datos de CE_{50} y E_{max} obtenidos de la vasoconstricción inducida por fenilefrina en riñón de Wistar macho y hembra en presencia de DuP 697.

	CE 50	CE 50	E_{max}	E_{max}
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar
Control	3.232±0.890	1.674±0.297	138.87±10.305	176.64±9.30
DuP 697	3.350±1.396	1.656±0.519	141.89±19.75	176.62±5.15

RESULTADOS LECHO VASCULAR MESENTÉRICO

Se evaluó la respuesta vascular a fenilefrina en lecho mesentérico de ratas macho y hembra en ausencia y presencia de L-NAME, y de los inhibidores selectivos de las diferentes isoformas de NOS y COX. En la fig. 12 se presenta la respuesta vascular a fenilefrina en machos y hembras, se observa que la fenilefrina provocó incrementó en la presión de perfusión en lecho vascular mesentérico, de manera dependiente de la concentración y no se observan cambios en la respuesta contráctil debida al sexo.

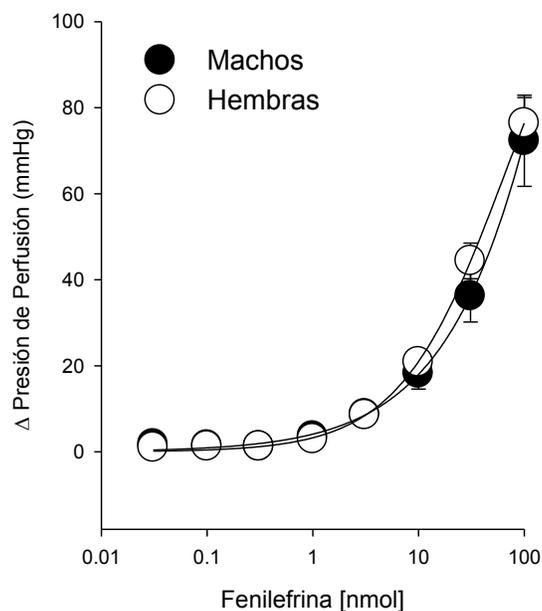


Fig. 12.- Respuesta a fenilefrina en lecho vascular mesentérico de machos y hembras Wistar

En la fig. 13 A y B se muestra que el L-NAME no provoca cambios en la presión de perfusión basal de lecho vascular mesentérico de ratas Wistar macho y

hembra, lo que sugiere que la regulación del tono vascular mesentérico no depende del NO* liberado basalmente en ambos sexos.

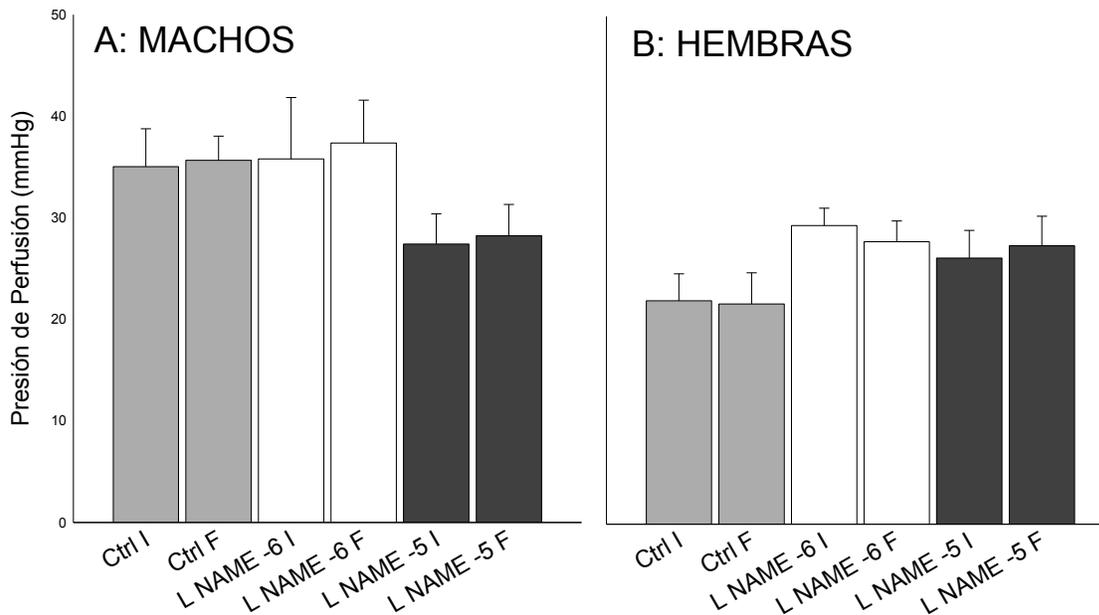


Fig. 13.- Efecto de L-NAME (inhibidor de las NOS) en la presión de perfusión basal en mesenterio de ratas Wistar, **A** macho y **B** hembra. (n=5-6 animales por grupo) I= Presión de perfusión inicial, F= Presión de perfusión final.

En presencia del inhibidor no selectivo de NOS (L-NAME) a concentraciones crecientes 1×10^{-6} y 1×10^{-5} M, en lecho vascular mesentérico de machos se observa un desplazamiento a la izquierda de manera dependiente a la concentración con respecto al control (Fig.14 A); asimismo ocurre una respuesta similar en hembras (Fig.14 B), esto sugiere que la estimulación de receptor $\alpha 1$ -adrenérgico aumenta la liberación de NO*, modulando el tono contráctil del lecho vascular mesentérico en machos y hembras. Cabe destacar que en el lecho vascular mesentérico de las hembras el L-NAME provocó mayor respuesta al estímulo del agonista

vasoconstrictor en comparación con machos, esto nos sugiere que en este sexo existe mayor participación de óxido nítrico en la regulación de tono vascular mesentérico al estímulo de la fenilefrina.

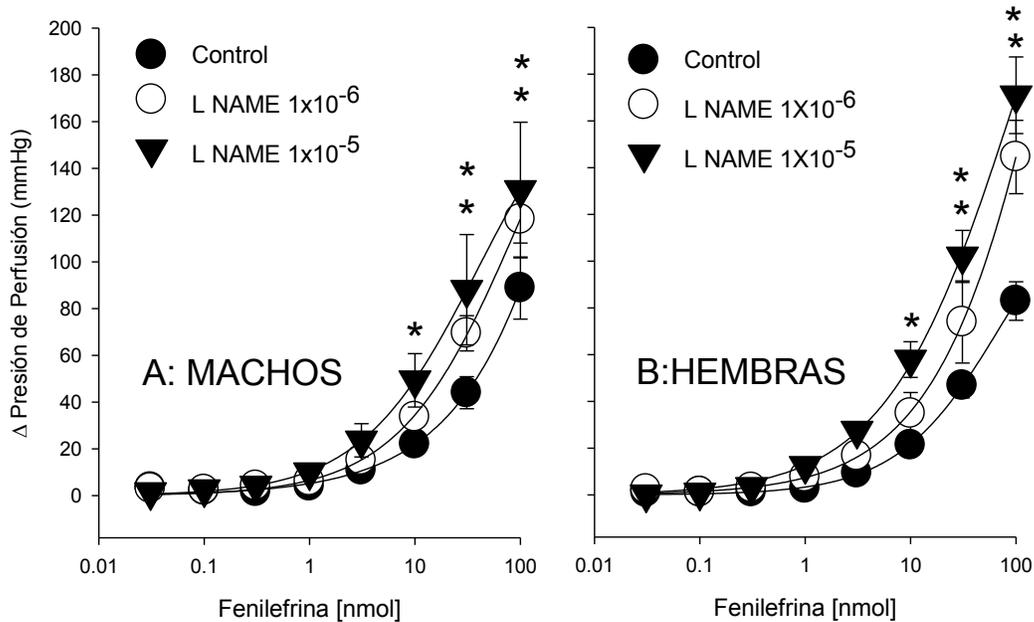


Fig. 14.- Efecto del L-NAME (Inhibidor de las NOS) en la vasoconstricción inducida por fenilefrina en mesenterio de ratas Wistar, **A** macho y **B** hembra. * $p < 0.05$ respecto al control ($n = 5-6$ animales por grupo).

En la figura 15 A y B se muestra que el inhibidor de iNOS no provoca aumento de la presión de perfusión basal inicial de lecho vascular mesentérico de ratas Wistar macho y hembra, por lo que se asume que esta isoforma no contribuye a la regulación del tono vascular basal en el lecho mesentérico de hembras y machos.

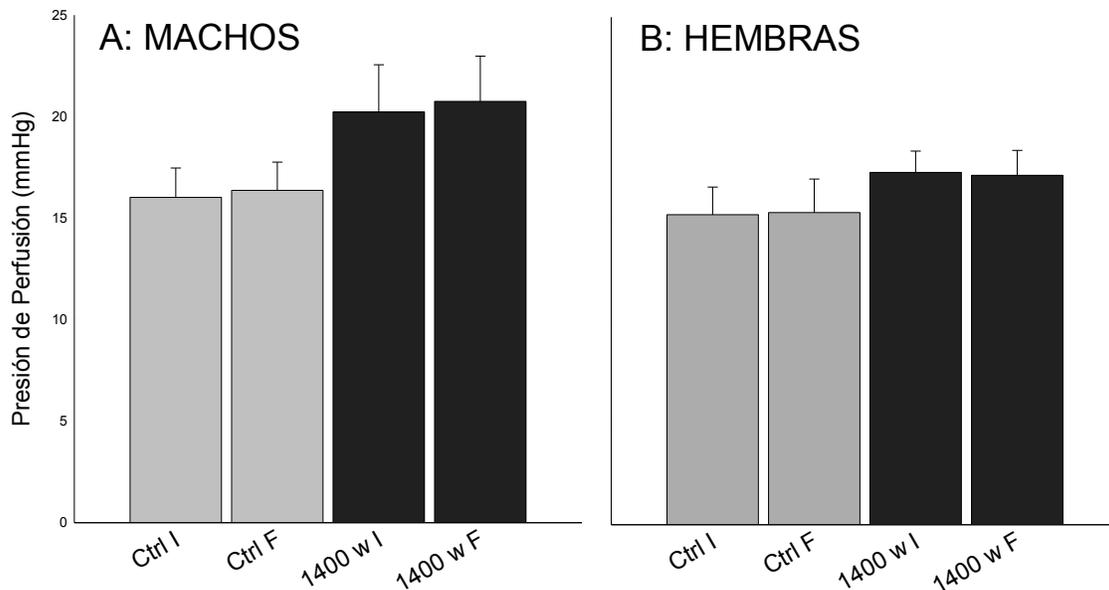


Fig. 15.- Efecto de 1400 W (inhibidor de las INOS) en la presión de perfusión basal en mesenterio de ratas Wistar, **A** macho y **B** hembra. (n=5-6 animales por grupo) I= Presión de perfusión inicial, F= Presión de perfusión final.

Se evaluó el efecto del inhibidor selectivo de la iNOS (1400W) a $1 \times 10^{-7} \text{M}$ sobre la respuesta contráctil inducida por fenilefrina en lecho vascular mesentérico de ratas Wistar hembras y machos. Como se puede observar en la Fig. 16 A la inhibición de la isoforma inducible de NOS no provocó cambios en el efecto vasopresor de la fenilefrina en el lecho vascular mesentérico de macho. Por el contrario en hembras (Fig. 16 B) se observa una mayor respuesta contráctil en presencia del inhibidor de iNOS. Por lo tanto, esta isoforma participa en la regulación del tono vascular inducido por la fenilefrina en lecho vascular mesentérico en hembras pero no en los machos.

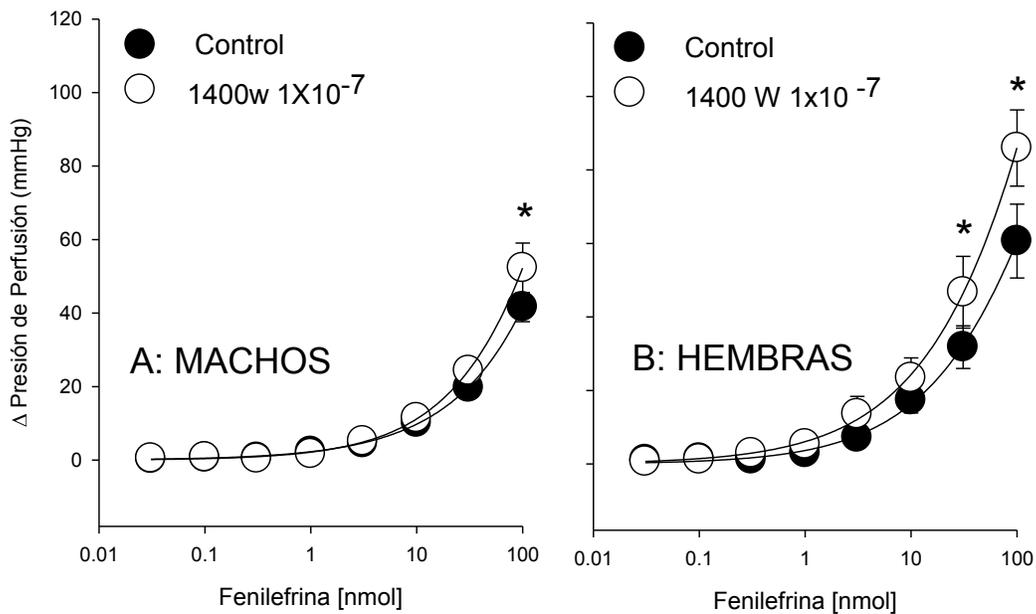


Fig. 16.- Efecto de 1400W (inhibidor de las iNOS) en la vasoconstricción inducida por fenilefrina en mesenterio de ratas Wistar, **A** macho y **B** hembra. * $p < 0.05$ respecto al control (n=5-6 animales por grupo).

En la gráfica 17 A y B se observa que el inhibidor de la isoforma neuronal de NOS no tiene efecto en la presión de perfusión basal inicial de lecho vascular mesentérico de ratas Wistar macho y hembra, por lo que esta isoforma no contribuye a la regulación del tono vascular mesentérico de las ratas Wistar.

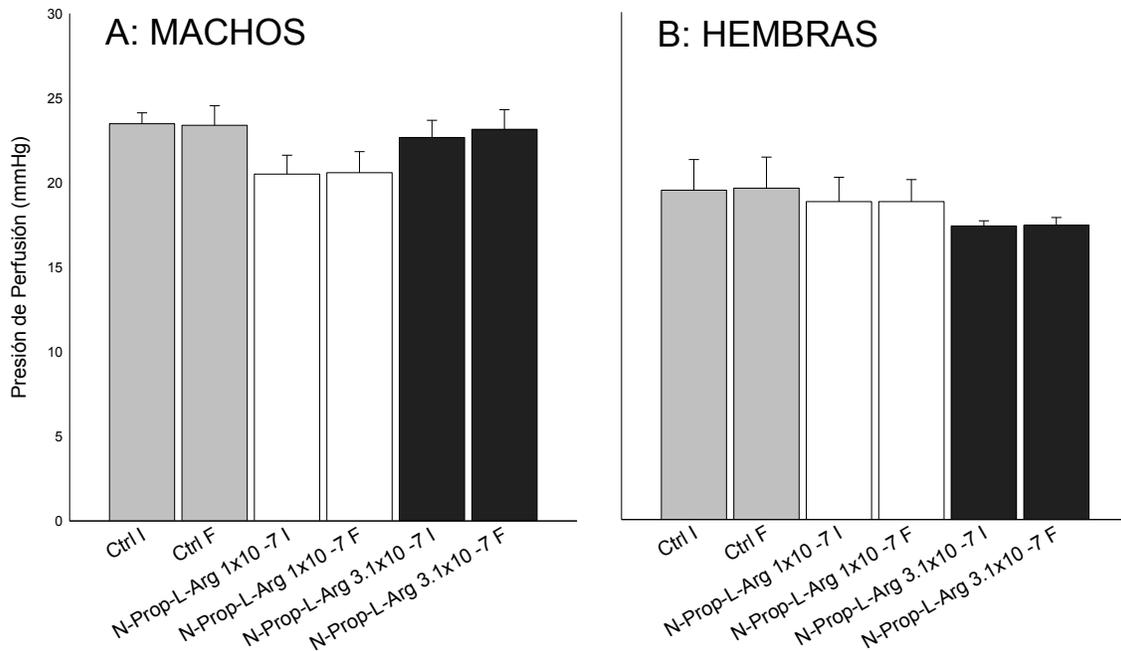


Fig. 17.- Efecto de N-propil-L-arginine (inhibidor de las nNOS) en la presión de perfusión basal en mesenterio de ratas Wistar, **A** macho y **B** hembra (n=5-6 animales por grupo) I= Presión de perfusión inicial, F= Presión de perfusión final.

Para evaluar la participación en el mantenimiento del tono vascular mesentérico de nNOS se evaluó la respuesta a fenilefrina en presencia del inhibidor selectivo de nNOS (N-propyl-L-arginine) a concentraciones crecientes $1 \times 10^{-7} \text{M}$ y $3.1 \times 10^{-7} \text{M}$. En lecho vascular mesentérico de machos (Fig. 18 A) se observa que la respuesta contráctil a fenilefrina cae con respecto al control, esto indica que probablemente la nNOS está ligada a la liberación de un agente vasoconstrictor en mesenterio de machos; por el contrario, en lecho vascular mesentérico de hembras (Fig. 18 B) se observa un ligero aumento en la respuesta contráctil con respecto al control, por lo que la nNOS tiene participación discreta en la regulación del tono vascular mesentérico de ratas Wistar machos y hembras.

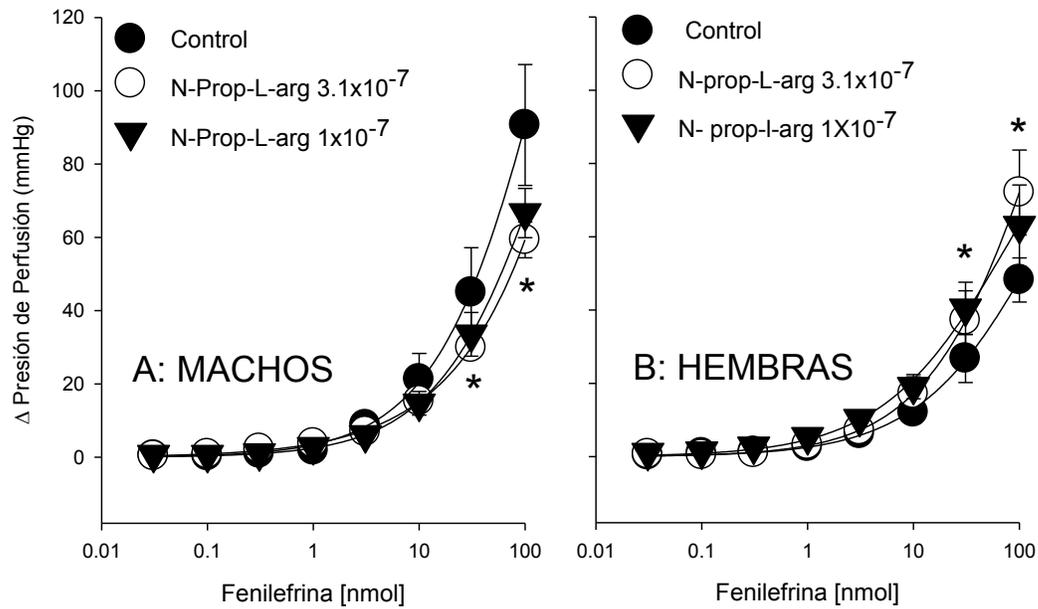


Fig. 18.- Efecto de N-propil-L-arginine (inhibidor de la nNOS) en la vasoconstricción inducida por fenilefrina en mesenterio de ratas Wistar, **A** macho y **B** hembra. * $p < 0.05$ respecto al control (n=5-6 animales por grupo).

En la figura 19 A y B se muestra que el inhibidor de COX 1 (SC 560) no tiene efecto en la presión de perfusión basal de lecho vascular mesentérico de Wistar macho y hembra, por lo que esta isoforma no regula el tono vascular mesentérico en condiciones basales.

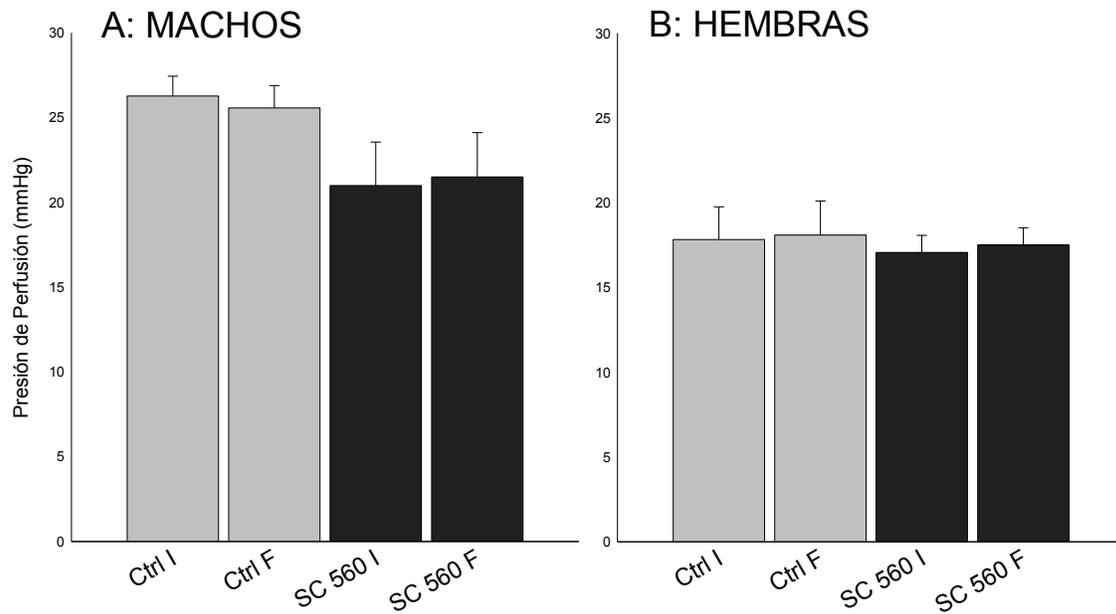


Fig. 19.- Efecto de SC 560 (Inhibidor de COX 1) en la presión de perfusión basal en mesenterio de ratas Wistar, **A** macho y **B** hembra. (n=5-6 animales por grupo). I= Presión de perfusión inicial, F= Presión de perfusión final.

Para determinar la participación de los prostanoïdes derivados de COX1 en la regulación del tono vascular mesentérico de ratas Wistar macho y hembra, se evaluó la respuesta inducida por fenilefrina en presencia del inhibidor selectivo SC560 a 1×10^{-7} M (Fig. 20 A y B), observándose en ambos sexos un incremento discreto al estímulo contráctil de fenilefrina, por lo tanto, los prostanoïdes vasodilatadores derivados de COX-1 tienen una contribución discreta en la regulación del tono vascular mesentérico inducido por fenilefrina en ambos sexos.

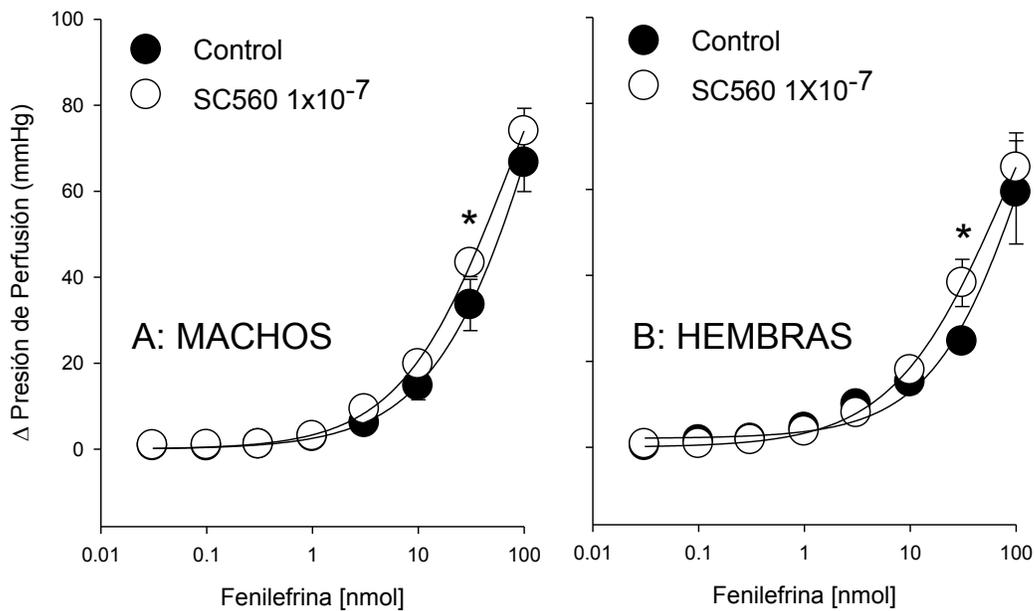


Fig. 20.- Efecto de SC 560 (inhibidor de COX 1) en la vasoconstricción inducida por fenilefrina en mesenterio de ratas Wistar, **A** macho y **B** hembra. * $p < 0.05$ respecto al control (n=5-6 animales por grupo).

Como se observa en la figura 21 A y B el inhibidor selectivo de COX 2 no tiene efecto alguno en la presión de perfusión basal, por lo que se sugiere que esta enzima no libera basalmente metabolitos que regulen el tono vascular mesentérico de ratas Wistar macho y hembra.

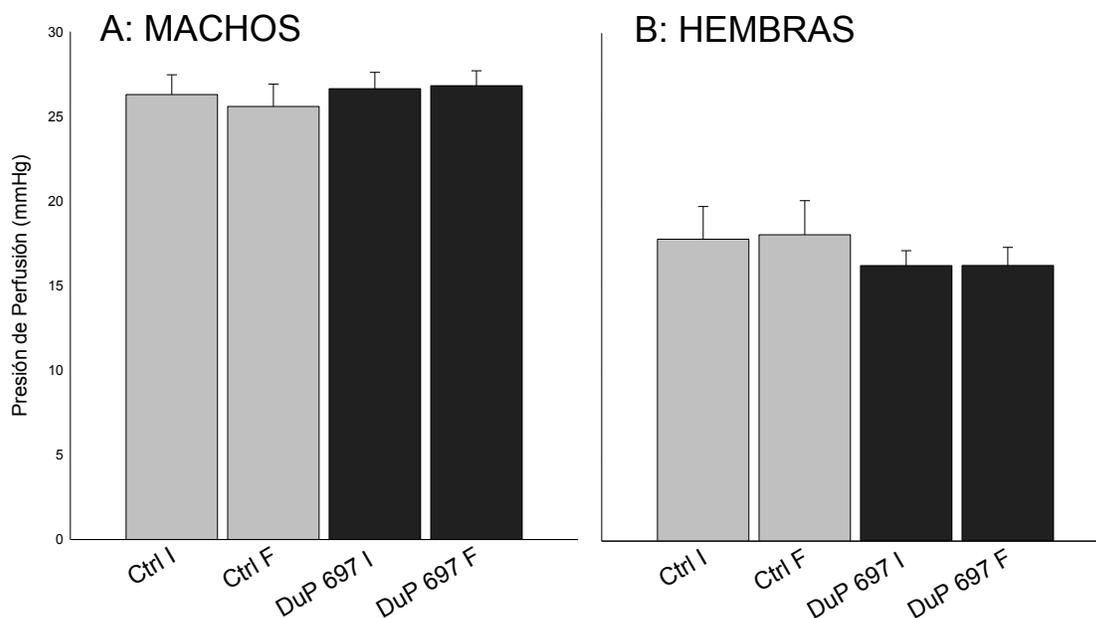


Fig. 21.- Efecto de DuP 697 (Inhibidor de COX 2) en la presión de perfusión basal en mesenterio de ratas Wistar, **A** macho y **B** hembra. (n=5-6 animales por grupo). I= Presión de perfusión inicial, F= Presión de perfusión final.

Para determinar la participación de COX 2 en el mantenimiento del tono vascular mesentérico de ratas Wistar macho y hembra, se evaluó el efecto del inhibidor selectivo de COX 2 DuP 697 (1×10^{-7} M) sobre la contracción inducida por fenilefrina. En la figura 22 A se observa la respuesta a fenilefrina en presencia del inhibidor selectivo de COX-2 en lecho vascular mesentérico de machos, se observó mayor respuesta con respecto al control, por lo tanto, los prostanoïdes vasodilatadores derivados de COX 2 participan en el mantenimiento del tono vascular mesentérico en ratas macho. Por lo contrario, tal efecto no se presenta en hembras, en la figura 22 B no hay diferencias en la respuesta contráctil con respecto al control por lo que en hembras, no hay participación de COX2 en el mantenimiento del tono vascular mesentérico.

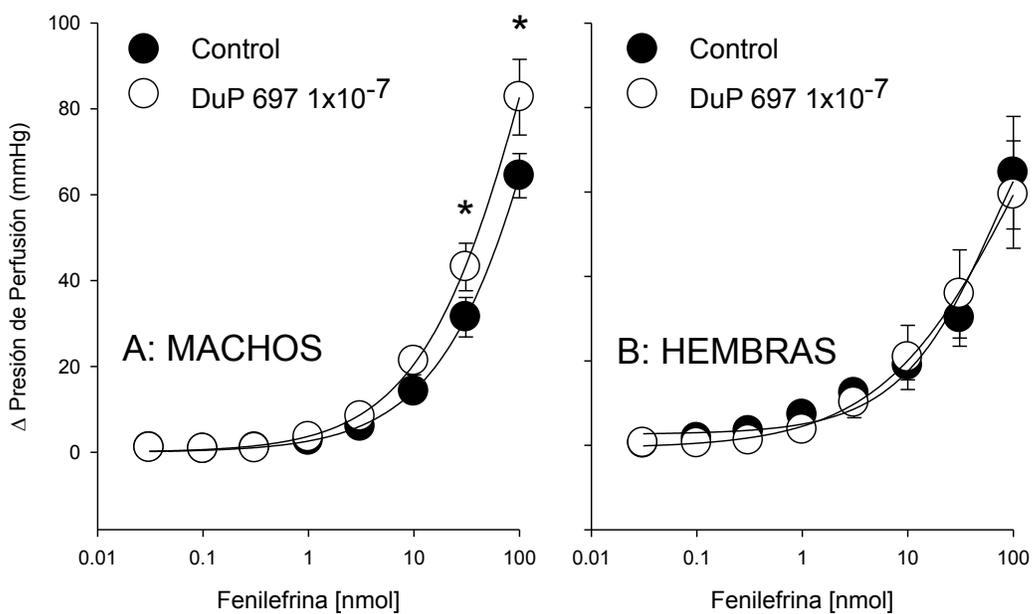


Fig. 22.- Efecto de DuP 697 (inhibidor de COX 2) en la vasoconstricción inducida por fenilefrina en mesenterio de ratas Wistar, **A** macho y **B** hembra. * $p < 0.05$ respecto al control (n=5-6 animales por grupo).

DISCUSIÓN

El presente estudio se realizó con la finalidad de conocer el papel de las diferentes isoformas de NOS y COX en la regulación del tono vascular de arterias de resistencia, en los lechos vasculares renal y mesentérico; además, determinar si hay diferencias funcionales entre ratas machos y hembras. Para este fin se utilizaron inhibidores selectivos de NOS y COX, disueltos en solución Krebs en constante perfusión de los diferentes lechos durante 30 minutos, posteriormente se realizó la vasoconstricción a fenilefrina.

Durante la incubación del riñón con los inhibidores de NOS, el L-NAME provocó aumento en la presión de perfusión basal, esto se observa tanto en machos como en hembras. Dado que los inhibidores selectivos de iNOS y nNOS no provocaron cambios en la presión de perfusión basal, es posible asumir que la isoforma endotelial (eNOS) produce el NO* que regula el tono vascular basal en el riñón. Esta isoforma está presente en el endotelio de toda la vasculatura y se ha demostrado su importancia en la regulación del tono muscular de arterias de conductancia como la aorta (Silva et al., 2014).

En el lecho vascular mesentérico de ratas macho y hembra, la presencia de los inhibidores de NOS, demuestra que las isoformas de NOS no participan en la regulación del tono vascular basal mesentérico.

Con respecto a los resultados obtenidos con los inhibidores de las isoformas de COX, se sugiere que estas enzimas tampoco participan en la regulación del tono vascular renal ni mesentérico de ratas machos y hembras, debido a que la

presencia de los inhibidores no modificaron la presión de perfusión basal de los diferentes órganos.

Durante la incubación del lecho vascular renal con el inhibidor L-NAME hubo diferencias funcionales con respecto al sexo de las ratas, es decir, la inhibición de la isoforma endotelial en los machos provocó mayor estímulo vasocontráctil a la fenilefrina, efecto no observado en hembras.

Este resultado sugiere que la eNOS regula el tono vascular al estímulo de la fenilefrina en machos, es decir, al estimularse el receptor adrenérgico la cascada de señalización asociada al receptor, activa la eNOS que sintetiza NO* contrarrestando así la vasoconstricción en las arterias de resistencia renales de Wistar macho. En este sentido, Silva et al. (2014) y Haynes et al. (2000) proponen que la fenilefrina activa la eNOS a través de la fosforilación de la Ser¹¹⁷⁷ debido a la activación de diferentes cinasas (Akt/PKB y PKA).

Por el contrario, en hembras como ya se mencionó el L-NAME no aumentó el estímulo contráctil por fenilefrina en riñón; sin embargo, el inhibidor selectivo de iNOS provocó mayor estímulo contráctil debido a la reducción de la síntesis de NO* derivado de la isoforma inducible. Aunque en machos también se presenta dicho efecto, es notablemente mayor en hembras, por lo que se sugiere que la isoforma inducible de NOS es la encargada de regular el tono vascular renal de hembras al estímulo contráctil de la fenilefrina.

Esta diferencia funcional en la regulación del tono vascular renal, entre sexos al estímulo de la fenilefrina pudiera ser debido a factores hormonales, en hembras 17-β estradiol está involucrado en la activación de la isoforma endotelial por activación de cinasas (PI3/Akt) (Haynes et al, 2000).

Durante el estímulo contráctil provocado por la fenilefrina en presencia del inhibidor de nNOS, no se observa aumento en la contracción, en los machos ni en la hembras, indicando que el papel de esta isoforma no es tan relevante como se observó con las otras isoformas, a pesar de que nNOS está presente de manera constitutiva en *macula densa* de riñón y desempeña un papel importante en la regulación de la filtración glomerular (Tojo et al., 2006).

Se ha descrito que COX 1 y 2 tienen una importante función en la hemodinámica renal (Abassi et al., 2001) ya que están presentes constitutivamente en diferentes estructuras de la nefrona; sin embargo, en este estudio las isoformas de COX no participan en la regulación del tono vascular al estímulo de la fenilefrina.

Los resultados con el inhibidor selectivo de COX 2 concuerdan con lo reportado por Cheng en 2002, en los cuales la inhibición de esta enzima no modifica la hemodinámica renal, sugiriendo así que COX 2 no participa en la regulación del tono vascular renal.

Alteraciones en la función de COX 1 y 2 están relacionadas con diferentes situaciones fisiopatológicas, en 2013 Ruiz-Leyja et al. estudiaron el papel funcional de las isoformas de COX presentes en riñón de un modelo de hipertensión espontánea (SHR) y su control normotenso Wistar Kyoto (WKY), se observó que en WKY al bloquear COX 1, la enzima está relacionada con la liberación de metabolitos contráctiles al estímulo provocado por la fenilefrina, los cuales pudieran ser TXA₂ o PGE₂, esto difiere con lo obtenido en el presente estudio, ya que no se encontraron diferencias significativas al estímulo contráctil en presencia del inhibidor de COX 1, una posible explicación a esta discrepancia podría ser la cepa (rata Wistar en este estudio) y la edad de las ratas, en el presente estudio

fueron utilizadas ratas de 8 semanas de edad, mientras que en el mencionado antecedente se utilizaron ratas de 6 meses de edad, sugiriendo que el papel de las COXs en la regulación del tono vascular renal depende de la edad, así la actividad de la COX 1 parece aumentar con la edad y libera factores contráctiles mientras que en edad juvenil no tiene mayor relevancia.

El bloqueo de COX 2 en riñón de machos no modifica la vasoconstricción provocada por la fenilefrina, por lo que esta enzima tampoco participa en la regulación del tono vascular renal inducido por fenilefrina de machos Wistar.

En hembras la inhibición de COX 1 aumentó el efecto máximo a la fenilefrina; sin embargo, la CE_{50} no es modificada, esto sugiere la discreta liberación de factores vasodilatadores que regulan el tono vascular al estímulo de la fenilefrina, en el caso del inhibidor de COX 2 no provocó efecto alguno al estímulo contráctil, por lo que esta enzima no regula el tono vascular renal de hembras Wistar.

Se ha descrito que la prostaciclina (PGI₂) es el principal metabolito de las células endoteliales de la microvasculatura renal y glomerulares (Nasrallah, 2005); sin embargo, en el presente estudio de ratas Wistar macho y hembra con 8 semanas de edad, parece que este metabolito no es sintetizado al estímulo de la fenilefrina ya que no se observa que se haya bloqueado una respuesta vasodilatadora.

En el lecho vascular mesentérico, al realizar el estímulo vasocontráctil con fenilefrina es evidente que hay mayor respuesta en presencia del inhibidor L-NAME al compararlo con su respectivo control, esto nos demuestra que la isoforma endotelial de NO* está participando en la regulación del tono mesentérico al estímulo de la fenilefrina tanto en ratas macho como en hembras.

El efecto vasocontráctil es mayor en presencia del inhibidor L-NAME en mesenterio de hembras, por lo cual se sugiere que en lecho vascular mesentérico de hembras existe mayor liberación de NO* en comparación con los machos, este dato concuerda con que las hembras producen más sustancias vasodilatadoras debido a factores hormonales (Haynes, 2000). Como se mencionó, entre los activadores de la eNOS están el 17-β estradiol y el estrés de rozamiento (*shear stress*) que activaran cinasas que fosforilan eNOS provocando liberación de NO* derivado de esta isoforma.

Al realizar el estímulo a la fenilefrina en presencia del inhibidor selectivo de iNOS en mesenterio se observaron efectos discretos; sin embargo, el efecto vuelve a ser notablemente marcado en hembras en comparación con los machos, sugiriendo una vez más que las hembras producen más NO* derivado de iNOS al estimular la vasoconstricción.

En los experimentos con el inhibidor de nNOS en mesenterio de machos, al estimular la vasoconstricción con fenilefrina, se observa que la respuesta cae con respecto al control, por lo que se sugiere que esta isoforma en lecho mesentérico de machos está ligada a la liberación de factores vasocontráctiles, dada que esta isoforma esta principalmente ubicada en sistema nervioso y pudiera estar ligada a la liberación de catecolaminas cuya función es la vasoconstricción, como la adrenalina o la noradrenalina.

Este resultado difiere con lo reportado en 2002 por Sullivan, ya que en ese estudio se utilizó un inhibidor selectivo de nNOS (VNIO 1×10^{-6} M) diferente al utilizado en este proyecto y reportan que la actividad de la nNOS está asociada a la relajación del tono mesentérico de ratas Sprague-Dawley, esto pudiera deberse a que se

trata de una cepa diferente de rata o que la concentración del inhibidor utilizado no es adecuada y por lo tanto se logra inhibir no solo a la sintasa neuronal, sino también a otras sintasas presentes, provocando mayor efecto vasocontráctil de la fenilefrina.

En el lecho mesentérico de hembras también se demuestra que la isoforma neuronal de NOS participa liberando NO* al estímulo contráctil, reafirmando que las hembras liberan mayor cantidad de NO* comparado con los machos.

Al realizar el estímulo vasocontráctil con fenilefrina en lecho mesentérico, se observó que COX 1 en hembras y machos libera de manera discreta prostanoïdes vasodilatadores, tales como PGI₂ o PGE₂, esto se sugiere debido a que se observan diferencias significativas en un punto, el inhibidor selectivo de COX 2 en machos promueve un efecto vasocontráctil más notable, ya que hay diferencias significativas en 2 puntos con respecto a su control y tal efecto no es observado en hembras, por lo que nuevamente se propone que en cuanto a COX 2 existen diferencias funcionales con respecto al género de las ratas, ambos liberan de manera discreta prostanoïdes vasodilatadores, pero en hembras derivados de COX 1 y en machos derivados de COX 1 y más notablemente de COX 2.

Cabe mencionar que el lecho vascular mesentérico presenta menor resistencia al flujo sanguíneo, esto debido a que las presiones de perfusión son menores en comparación con el lecho vascular renal, una posible explicación a esto es que al momento de aislarlo es desprendido de los intestinos, provocando así la pérdida parcial de la vasculatura de resistencia que irriga a los intestinos.

El lecho mesentérico está rodeado de tejido adiposo perivascular, este tejido libera sustancias que también tienen efectos en la regulación del tono vascular, tales

como leptina y adiponectina principalmente, además también libera prostanoïdes, es decir, los prostanoïdes derivados de COX no solamente son sintetizados en células endoteliales también en los adipocitos, los cuales son fuente de ácido araquidónico el cual es el sustrato de las COX y se ha reportado que el tejido adiposo perivascular libera principalmente sustancias vasodilatadoras, ya que en ausencia de este tejido la respuesta contráctil adrenérgica a fenilefrina se ve aumentada (Mendizábal, 2013).

En el presente estudio no se determinó la influencia de este tejido en cuanto a la liberación de NO* o prostanoïdes, por lo que en los presentes resultados no es claro determinar si estos provienen del endotelio de la vasculatura o del tejido adiposo.

CONCLUSIONES

No se encontraron diferencias dependientes del sexo en el efecto vasopresor a la fenilefrina en el lecho vascular renal y mesentérico de ratas Wistar.

La actividad basal de la eNOS regula el tono vascular renal de ratas macho y hembra, mientras que las otras isoformas de NOS, así como las COX 1 y 2 no participan en este proceso.

La inhibición de la síntesis de NO* con L-NAME incrementa la vasoconstricción inducida por fenilefrina en lecho vascular renal de ratas macho y la inhibición de la síntesis de NO* con 1400 W (inhibidor de la iNOS) incrementa la vasoconstricción en lecho renal de hembras, lo que sugiere que existen diferencias dependientes del sexo en la isoforma de NOS que regula el tono vascular renal inducido por la fenilefrina.

La eNOS participa en la regulación de tono vascular mesentérico inducido por fenilefrina de ambos sexos, pero tiene un papel más importante en el mesenterio de hembras. En lecho mesentérico de machos, el inhibidor de la nNOS disminuye el efecto contráctil provocado por la fenilefrina con respecto al control, este efecto sugiere liberación de factores vasoconstrictores.

En lecho vascular renal de ratas macho y hembra, la inhibición de las COX 1 y 2 no modificaron la contracción provocada por la fenilefrina.

En lecho mesentérico de machos la inhibición de la COX 2 provoca un ligero aumento del efecto contráctil de la fenilefrina, mientras que este efecto no se presenta en hembras. La inhibición de la COX 1 no modificó el efecto vasopresor de la fenilefrina en el lecho mesentérico.

BIBLIOGRAFIA

- Abassi Z., Brodsky S., Gealekman O., Rubinstein I., Hoffman A., Winaver J., 2001. Intrarenal expression and distribution of cyclooxygenase isoforms in rats with experimental heart failure. *Am J Renal Physiol.* 280: F43 - F53.
- Alp NJ., Mussa S., Khoo J., Cai S., GUzik T., Jefferson A., Goh N., Rockett KA., Channon KM., 2003. Tetrahydrobiopterin dependent preservation of nitric oxide-mediated endothelial function in diabetes by targeted transgenic GTPcyclohidrolase over expresión. *J Clin Invest.* 112: 725 - 735.
- Arendshorst WJ and Navar LG. 2007. Renal circulation and glomerular hemodynamics In: *Diseases of the Kidney and Urinary Tract.* Ed. Schrier RW. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins. 54 - 95.
- Battilana C. 1997. El riñón en la hipertensión arterial esencial. *Rev. Perú. Cardiol.* 23(3): 26 - 31.
- Boffa J., Just A., Coffman TM and Arendshorst WJ., 2004. Thromboxane receptor mediates renal vasoconstriction and contributes to acute renal failure in endotoxemic mice. *J Am Soc Nephrol.* 15: 2358 - 2365.
- Breyer MD, Zhang Y., Guan YF., Hao CM., Hebert RL. and Breyer RM., 1998. Regulation of renal function by prostaglandin E receptors. *Kidney Int Supp.* 67: S88 - S94.
- Cheng HF. and Harris RC. 2004. Cyclooxygenases, the kidney, and hypertension. *Hypertension* 43: 525 - 530.
- Francois H., Coffman TM., 2004. Prostanoids and blood pressure: which way is up?. *J Clin Invest.* 114: 757 - 759.

- Fukunaga M., Yura T., Grygorczyk R. and Badr KF. 1997. Evidence for the distinct nature of F₂-isoprostane receptors from those of thromboxane A₂. *Am J Physiol Renal Physiol.* 272: F477 - F483.
- Furchgott RF. and Zawadzki JV. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373 - 376.
- Gabbai FB., Hammond TC., Thomson S., 2002. Effect of acute iNOS inhibition on glomerular function in tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int.* 61: 851 - 854.
- Gerard J. Tortora y Sandra Reynolds Grabowski. 2003. en *Principios de Anatomía y Fisiología*. Ed. Oxford. México. Capítulo 21.
- Guyton y Hall. 2011. *Tratado de fisiología médica*. 12^a Edición. Fisiología Renal. 304 - 307
- Guyton y Hall. 2011. *Tratado de fisiología médica*. 12^a Edición. Fisiología Gastrointestinal. 759 - 762.
- Harrison DG., 1997. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest.* 100: 2153 - 2157.
- Haynes M., Sinha S., Russell K., Collinge M., Fulton D., Ruiz M., Sessa W., Bender J., 2000. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via PI3-Kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res.* 87: 677 - 682.
- Ibarra M., Lopez- Guerrero JJ., Mejida- Zepeda R., Villalobos-Molina R. 2006. Endothelium- dependent inhibition of the contractile response is decreased in

aorta from aged and spontaneously hypertensive rats. Arch Med Res. 37: 334 - 341.

Ibarra M, Meneses A, Ransanz V, Castillo C, Hong E. 1995. Changes in endothelium- dependent vascular responses associated with spontaneously hipertensive rats. Arch Med Res. 26 Spec No: S177 - 83.

Ichihara A. and Navar LG. 1999. Neuronal NOS contributes to biphasic autoregulatory response during enhanced TGF activity. Am J Physiol. 277: F113 - F120.

Komhoff M., Grone HJ., Klein T., Seyberth HW., Nusing RM. 1997. Localization of ciclooxigenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. Am J. Physiol. 272: F460 - F468.

Kone C. 2004. Nitric oxide synthesis in the kidney: isoforms, biosynthesis, and function in health. Sem in Nephrology. 24: 299 - 315.

Lamas S., Rodriguez D. 2012. Endothelial control of vasomotor tone: the kidney perspective. Sem in Nephrology. 32: 156 - 166.

Landmesser U., Drexler H. 2007. Endothelial function and hypertension. Curr Opin Cardiol. 22: 316 - 320.

Levonen AL., Patel RP., Brookes P. 2001. Mechanisms of cell signaling by nitric oxide and peroxynitrite: From mitochondria to MAP kinases. Antioxid Redox Signal. 3: 215 - 229.

Majid DS., Navar LG. 2001. Nitric oxide in the control of renal hemodynamics and excretory function. Am J Hypertens. 14: 74S - 82S.

- Mattson DL., Wu F. 2000. Control of arterial blood pressure and renal sodium excretion by nitric oxide synthase in the renal medulla. *Acta Physiol Scand.* 168: 149 - 154.
- Mendizábal Y., Llorens S., Nava E. 2013. Vasoactive effects of the prostaglandins from the perivascular fat of mesenteric resistance in WKY and SHROB rats. *Life scie.* 93: 1023 - 1032.
- Mulvany MJ., Aakjaer C. 1990. Structure and function of small arteries *Physiol. Rev.* 70: 921 -961.
- Nasrallah R and Hebert RL. 2005. Prostacyclin signaling in the kidney: implications for health and disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F235 - F 246.
- Navar LG., Inscho EW., Majid SA., Imig JD ., Harrison-Bernard LM., and Mitchell KD . 1996. Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiol Rev.* 76: 425 - 536.
- Ohkubo S , Nakahata N and Ohizumi Y . 1996. Thromboxane A2-mediated shape change: independent of Gq-phospholipase C–Ca² pathway in rabbit platelets. *Br J Pharmacol.* 117: 1095 - 1104.
- Pérez-Sala, D., & Lamas, S. 2001. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by nitric oxide in cells. *Antioxidants and Redox Signaling*, 3: 231 - 248.
- Pohl U., De Wit C. Gloe T. 2010. Large arterioles in the control of blood flow: role of endothelium- dependent dilation. *Act. Physiol Sacnd.* 168. 505 - 510.
- Pollock DM., Sullivan JC., Pollock JS., 2002. Altered nitric oxide synthase 3 distribution in mesenteric arteries of hypertensive rats. *Hypertension.* 39: 597 - 602.

- Qi Z., Hao CM., Langenbach RI., Breyer RM., Redha R., Morrow JD. and Breyer MD . 2002. Opposite effects of cyclooxygenase-1 and - 2 activity on the pressor response to angiotensin II. *J Clin Invest.* 110: 61 - 69.
- Rochette L., Lorin J., Zeller M., Guiland JC., Lorgis L., Cottin Y., Vergely C. .,2013. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets?,*Pharmacol. Ther.* 3: 239 - 257.
- Rosenblum JD., Boyle CM., Schwartz LB. 1997. The mesenteric circulation. Anatomy and physiology. *Surg Clin North Am.* 77: 289 - 306.
- Ruiz-Leyja E., Villalobos-Molina R., Lopez-Guerrero J., Gallardo-Ortiz A., Estrada-Soto E., Ibarra-Barajas M. 2013. Differential role of cyclooxygenase-1 and -2 on renal vasoconstriction to α_1 -adrenoreceptor stimulation in normotensive and hypertensive rats. *Life Scien.* 93: 552 - 557.
- Sastre E., Rodas I., Rivero J., Balfagon G., 2010. Inervacion perivascular de la arteria mesentérica superior: Implicaciones fisiopatologicas. *Rev Neurol.* 50 12: 727 - 737.
- Schmidt HHHW., Lohmann SM. and Walter U. 1993. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochimica et Biophysica Acta* 1178: 153 - 175.
- Silva B., Pernomian L., Grando m., Bendhack L. 2014. Phenylephrine activates eNOS Ser 1177 phosphorylation and nitric oxide signaling in renal hypertensive rat aorta. *Eur J of Pharm.* 738: 192 - 199.
- Smith W., Garavito R., & DeWitt D. 1996. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *The J of Biol Chem.* 271: 33157 - 33160.

- Sugimoto Y., Namba T., Shigemoto R., Negishi M., Ichikawa A. and Narumiya S. 1994. Distinct cellular localization of mRNAs for three subtypes of prostaglandin E receptor in kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 266: F823 –F 828.
- Sullivan C, Giulumian A, Pollock D, Fuchs L and Pollock J. 2002. Functional NOS1 in the mesenteric arterial bed. *Am. J of phisiol heart circ*. 283: H658 - H663.
- Tang, E. H., & Vanhoutte, P. M. 2008. Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. *Physiol Genomics*. 32: 409 - 418.
- Tojo A., Onozato M., Fujita T., 2006. Role of macula densa neuronal nitric oxide synthase in renal diseases. *Med Mol Morphol*. 39: 2-7
- Vanhoutte PM., Shimokawa H., Tang EH., and Félétou M. 2009. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)*. 196: 193 - 222.
- Verma S. and Anderson TJ. 2002. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation*. 105: 546 - 549.
- Yang, D., Gluais, P., Zhang, J. N., et al. 2004. Nitric oxide and inactivation of the endothelium-dependent contracting factor released by acetylcholine in spontaneously hypertensive rat. *J of Card Pharm*. 43: 815 - 820.